

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

INHIBIDORES DE LAS FOSFODIESTERASAS Y FUNCION MIOCARDICA

María Isabel Argel
- 1980 -

El presente trabajo de Tesis para optar al Doctorado en Ciencias Bioquímicas, - ha sido desarrollado en la Cátedra de - Fisiología con Biofísica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad - Nacional de la Plata.

Se realizó mientras la autora fue becaria de la Comisión de Investigaciones - Científicas de la Provincia de Buenos - Aires, bajo la dirección del Dr. Horacio Eugenio Cingolani.

Agradezco al Dr. Horacio Eugenio Cingolani y a la Dra. Gladys E. Chiappe de Cingolani y sus colaboradores por la dirección, ayuda y estímulo brindados para la realización de este trabajo.

Mi reconocimiento:

A la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de la Plata, a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haber brindado los medios para la realización de este trabajo.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires por las becas que oportunamente me otorgara.

a mi madre

a mi esposo

INDICE

Página

I.- INTRODUCCION	
1.- Generalidades	1
2.- AMPc y contractilidad	3
Adenilil ciclasa	3
AMPc	4
3.- Proteínas quinasas AMPc-dependientes	5
4.- Fosfodiesterasas de Nucleótidos Cíclicos	9
5.- GMPc y contractilidad	12
Guanil ciclasa	12
GMP cíclico	12
6.- Proteína quinasa GMPc-dependiente	13
II.- OBJETIVOS	14
III.- MATERIAL Y METODOS	
1.- Perfusión de los corazones	15
2.- Determinación de actividad de Proteína quinasa AMPc-dependiente	17
3.- Determinación de niveles de nucleótidos cíclicos: AMPc y GMPc	18
IV.- RESULTADOS	
1.- Grupo control	20
2.- Efectos de la perfusión con Teofilina 2×10^{-4} M	22
3.- Efectos de la perfusión con Papaverina 10^{-5} M	24
4.- Efectos de la perfusión con Pentoxifilina 10^{-4} M	26
V.- DISCUSION Y CONCLUSIONES	30
VI.- BIBLIOGRAFIA	35

1.- INTRODUCCION

1.- Generalidades

La función del corazón como bomba, depende de la coordinación de las actividades mecánica, eléctrica y metabólica - de las células miocárdicas. Dichas actividades están sujetas a la regulación nerviosa y hormonal, principalmente a través del sistema nervioso autónomo y sus sustancias transmisoras, - noradrenalina y acetilcolina, como así también por las catecolaminas circulantes como adrenalina. Además, otras hormonas y aún sustancias capaces de ejercer una acción parecida a la - hormonal que actúan directamente o por interacción con las catecolaminas producen efectos similares sobre la función y el metabolismo cardíacos. Toda la actividad reguladora estaría - dirigida hacia el calcio (Ca^{++}), el principal modulador de la actividad cardíaca. En muchas instancias de este mecanismo regulador estarían involucrados los nucleótidos cíclicos: adenosín 3':5' monofosfato cíclico (AMPc) y guanosín 3':5' monofosfato cíclico (GMPc) como sus intermediarios intracelulares.

De acuerdo a teorías ampliamente aceptadas, el AMPc, descubierto en 1957 por Sutherland y colaboradores (1-2), sería el mediador intracelular de señales hormonales que ejercen sus efectos a través de la activación de proteínas quinasas AMPc-dependientes (3). Estas enzimas catalizan la transferencia del fosfato terminal del adenosintrifosfato (ATP) a - sustratos proteícos, provocándoles una modificación en sus - propiedades.

El GMPc fue descubierto 6 años más tarde por Price y colaboradores (4). Por su importancia biológica también ha sido propuesto como mediador intracelular de señales hormonales extracelulares a través de un mecanismo similar al del AMPc, es decir, mediante la activación de una proteína quinasa GMPc dependiente (5-6). En el desarrollo de sus funciones regulatorias las dos nucleótidos pueden actuar independientemente o - bien como un par de antagonistas (7).

De acuerdo al concepto corriente de acción hormonal - mediada por el "segundo mensajero" AMPc, la secuencia de reacciones bioquímicas involucradas comprende los siguientes pasos: 1) Estimulación de la adenilciclase (adenilil-ciclase) - sensible a hormonas u otra señal extracelular, 2) Acumulación de AMPc intracelular, 3) Activación por el AMPc formado de las proteínas quinasas AMPc-dependientes, 4) Fosforilación de enzimas u otras proteínas mediada por las proteínas quinasas activas, 5) Efecto o efectos biológicos.

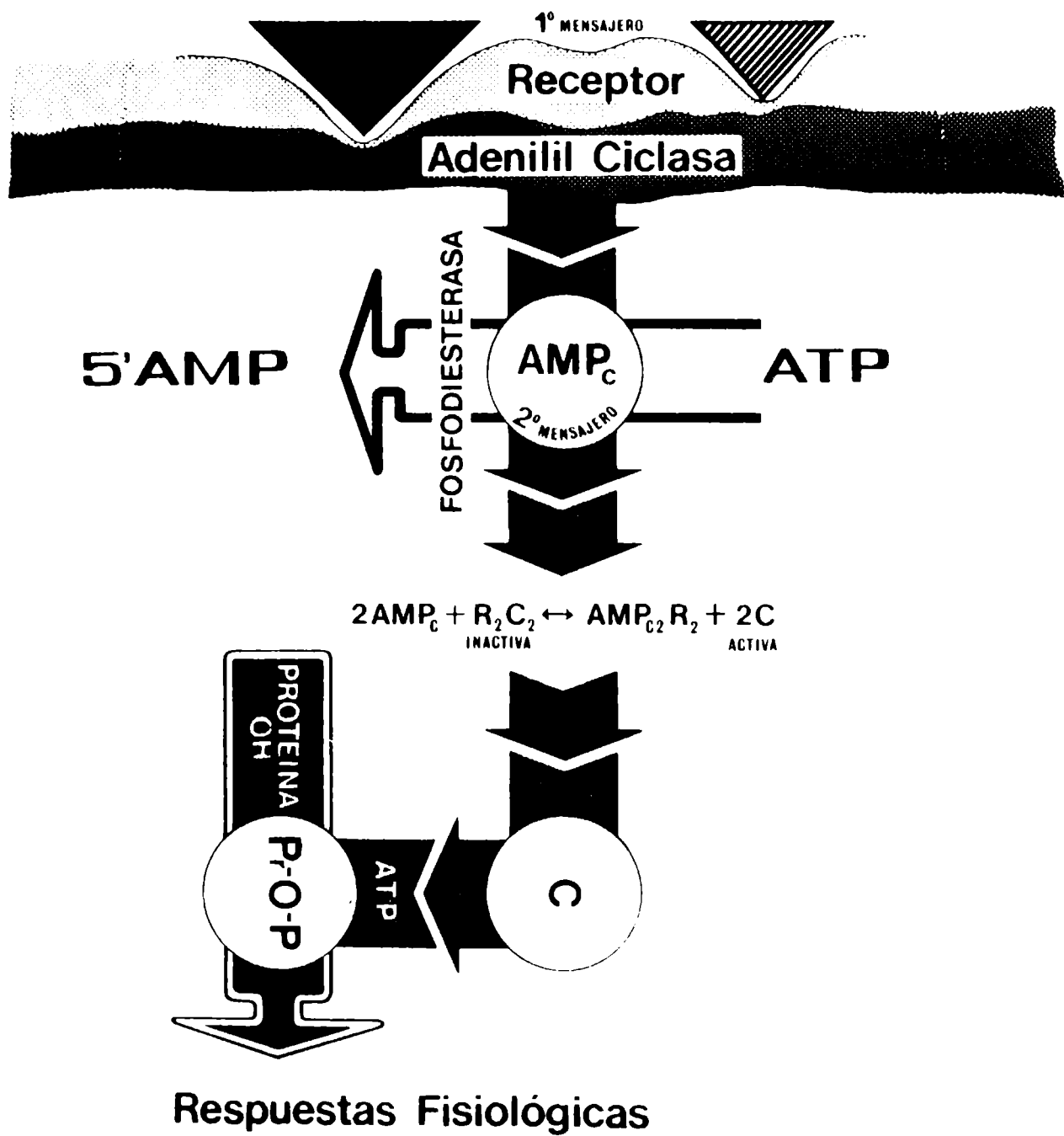


Figura 1 : Representación esquemática del mecanismo de acción de las hormonas y drogas que incrementan los niveles intracelulares de AMPc.

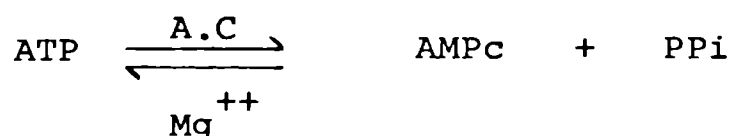
En contraposición con la relativamente bien documentada secuencia anterior, la cascada análoga para el GMPc, ha sido confirmada parcialmente. Se ha propuesto al GMPc como "segundo mensajero" de las sustancias que ejercen su acción por estímulo de los receptores muscarínicos y se ha sugerido que actuaría en forma análoga al AMPc, es decir: 1) Estimulación de la guanil ciclase (guanilil ciclase) por hormonas u otras sustancias, 2) Formación de GMPc intracelular, 3) Fosforilación de proteínas mediada por el aumento de GMPc el cual estimularía la proteína quinasa GMPc-dependiente, 4) Respuesta fisiológica.

Se debe agregar que la defosforilación enzimática de las fosfoproteínas formadas y la degradación de los nucleótidos cíclicos por medio de las fosfodiesterasas, enzimas que los transforman en 5' AMP y 5' GMP inactivos, es el modo de terminar el efecto celular de los nucleótidos cíclicos y restablecer la homeostasis celular. Por lo tanto, la regulación de los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos en los sistemas biológicos es función directa de ambas velocidades de síntesis y degradación.

2.- AMPc y contractilidad

Adenilil Ciclase

La conversión enzimática del adenosintrifosfato (ATP) a AMPc fue descripta por Sutherland y colaboradores en 1962 (8). Demostraron que la enzima denominada por ellos adenil ciclase (AC) catalizaba con requerimiento de Mg^{++} la siguiente reacción:



La adenil ciclase miocárdica se encuentra localizada preferentemente en la membrana plasmática (9-11) aunque también se ha detectado actividad de adenil ciclase en preparaciones de retículo sarcoplásmico (12-13).

Se han llevado a cabo investigaciones tratándo de establecer las propiedades moleculares del receptor beta y su relación con la adenil ciclase, encontrándose que en poblaciones celulares puras representan entidades independientes (14-15). La localización celular del receptor beta y de la adenil ciclase en el músculo cardíaco todavía no ha sido resuelta, -

probablemente debido a la dificultad para obtener preparaciones de membranas puras, que representen al sarcolema, al retículo sarcoplásmico o a otras membranas subcelulares.

La adenil ciclasa es afectada por diferentes hormonas y drogas (9,16-18) y se ha propuesto que actuaría tanto como discriminadora de señales, como generadora de las mismas. Por este mecanismo la señal extracelular inicial representada por el primer mensajero hormona o droga, es transmitida al segundo mensajero, AMPc, dentro de la célula. Esta señal será amplificada y la respuesta final depende del perfil enzimático y - del tipo de célula involucrada (19).

AMPc

Desde que en 1962 Murad y colaboradores (20) sugirieron que el AMPc estaría involucrado en la función del corazón, se han llevado a cabo diversos estudios para establecer el papel del nucleótido en la actividad cardíaca.

Se ha demostrado que las catecolaminas "in vivo" o en corazones aislados y perfundidos, producen un rápido incremento en los niveles intracelulares de AMPc que precede a la respuesta contráctil (21-27). Estos estudios aportan la evidencia de que el AMPc actúa como mediador del efecto inotrópico positivo de las catecolaminas. Además, dichos resultados se apoyan en el hecho de que las catecolaminas estimulan la actividad de la adenil ciclasa en preparaciones de membranas de - corazón de diversas especies y de que su potencia de activación es similar a la potencia de su respuesta inotrópica (20, 28-30).

Otros trabajos presentan evidencias en contra del papel del AMPc como mediador del efecto inotrópico positivo (31-33). La dificultad en probar que el AMPc se encuentre involucrado en la mecánica cardíaca reside en el hecho de que el - AMPc exógeno no produce efecto inotrópico positivo debido a - la poca permeabilidad de la membrana para el nucleótido y a - su rápida destrucción intracelular por acción de las fosfodiesterasas. En estudios realizados en corazones de cobayo cuyas - membranas se habían hecho permeables al AMPc, se logró activar la fosforilasa sin obtener cambios en el comportamiento contráctil, pero no se obtuvieron evidencias de que el AMPc intracelular hubiese realmente aumentado (34). Se ha utilizado un - derivado del AMPc, el dibutiril AMPc (N^6 , 2'-o- dibutiril AMPc) que es más permeable y es menos hidrolizado por las fosfodiesterasas. El dibutiril AMPc produce efecto inotrópico positivo

en músculo papilar (35-36), en corazones perfundidos (37-38) y en preparaciones de aurícula (39-40).

El AMPc está también involucrado en los efectos cardíacos que producen los agentes inhibidores de las fosfodiesterasas, tales como metilxantina y derivados (41) y papaverina (42).

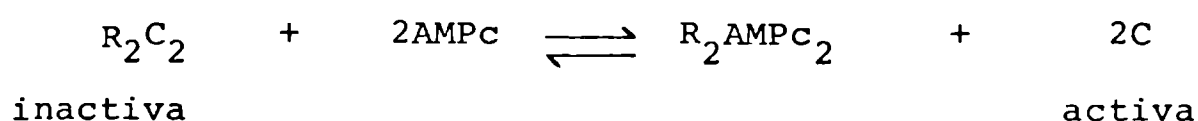
La relación entre el comportamiento contráctil del miocardio y las hormonas y drogas que actúan vía AMPc es compleja e implica cambios simultáneos y secuenciales en una variedad de parámetros.

3.- Proteínas quinasas AMPc-dependientes

El AMPc formado en el miocardio produce cambios en la función y el metabolismo debido, al menos en parte, a la activación de las proteínas quinasas AMPc-dependientes (43-48).

La actividad de proteínas quinasas AMPc-dependientes fue descrita por Krebs y colaboradores en músculo esquelético de conejo (49). Posteriormente se encontró actividad de proteínas quinasas AMPc-dependientes en una variedad de especies y tejidos, entre ellos el músculo cardíaco (48,50-51).

El mecanismo por el cual el AMPc activa las proteínas quinasas AMPc-dependientes ha sido estudiado extensivamente (52-55) y se representa por la siguiente ecuación:



La enzima inactiva R_2C_2 consiste en dos subunidades distintas, una subunidad (R) regulatoria que une AMPc e inhibe la actividad de la subunidad (C) catalítica en ausencia del nucleótido. La disociación de la holoenzima por el AMPc, resulta en la formación de dos subunidades monoméricas con actividad catalítica y un dímero de subunidades regulatorias que une 2 moléculas de AMPc. La subunidad C libre es la que cataliza la fosforilación de proteínas. Esta reacción es reversible, por lo tanto la remoción del AMPc resulta en la recombinación de las subunidades regulatorias y catalíticas que forman el complejo R_2C_2 , es decir, la holoenzima inactiva (43-45,56-58).

Se han caracterizado dos tipos de proteínas quinasas AMPc-dependientes a las que se denominó Tipo I y II respectivamente (53-54) y el esquema general por el cual el AMPc las activa es el mismo para ambas. En el músculo ventricular bovino predomina la de tipo II, mientras que en el músculo esquelético de conejo la de tipo I. El ventrículo de rata contiene igual

cantidad de ambas formas, la de tipo II predomina en la fracción particulada y la de tipo I en la fracción citosólica, lo cual sugiere la compartimentalización de los dos tipos de isoenzimas.

Las subunidades catalíticas de las isoenzimas de tipo I y II son idénticas en su estructura y comportamiento, mientras que las subunidades regulatorias presentan propiedades físicas distintas. Las subunidades C tienen idéntica especificidad de sustrato incluso con velocidades relativas de fosforilación iguales. La subunidad R de la isoenzima de tipo I tiene un peso molecular ligeramente mayor que la de tipo II. In vitro, el comportamiento que presentan ambas isoenzimas es distinto, la de tipo I se disocia rápidamente a altas concentraciones salinas o de histona, mientras que la de tipo II sólo lo hace débilmente. La isoenzima de tipo II cataliza la autofosforilación de su subunidad regulatoria, con la incorporación de 2 moles de fosfato por mol de holoenzima (53;59-61). La autofosforilación de la enzima de tipo II ocurre en el complejo R_2C_2 , es decir que no es necesaria la presencia de la subunidad C libre. La desfosforilación de la subunidad R por una fosfoproteína fosfatasa se estimula cuando las dos subunidades R y C se disocian por acción del AMPc (62). Las formas fosforilada y defosforilada de la enzima de tipo II unen AMPc con la misma afinidad, sin embargo, la defosforilada se reasocia más rápidamente con la subunidad catalítica (60). La subunidad R de tipo I parece no autofosforilarse (61).

La fosforilación de proteínas catalizada por la proteína quinasa AMPc-dependiente requiere ATP y Mg^{++} , el fosfato γ del ATP se incorpora como ester a un residuo de serina o treonina de la proteína sustrato.

Es decir que el aumento de AMPc intracelular en tejido cardíaco activa la proteína quinasa AMPc-dependiente, la cual fosforila proteínas del sarcolema, del retículo sarcoplásmico y del aparato contráctil lo que origina un aumento del influjo de calcio a través de la membrana plasmática (63), un aumento de calcio acumulado por el retículo sarcoplásmico (64-68) y un incremento de la sensibilidad de la troponina al calcio (69 - 71), con el consiguiente aumento de la contractilidad miocárdica, es decir, el desarrollo del efecto inotrópico positivo.

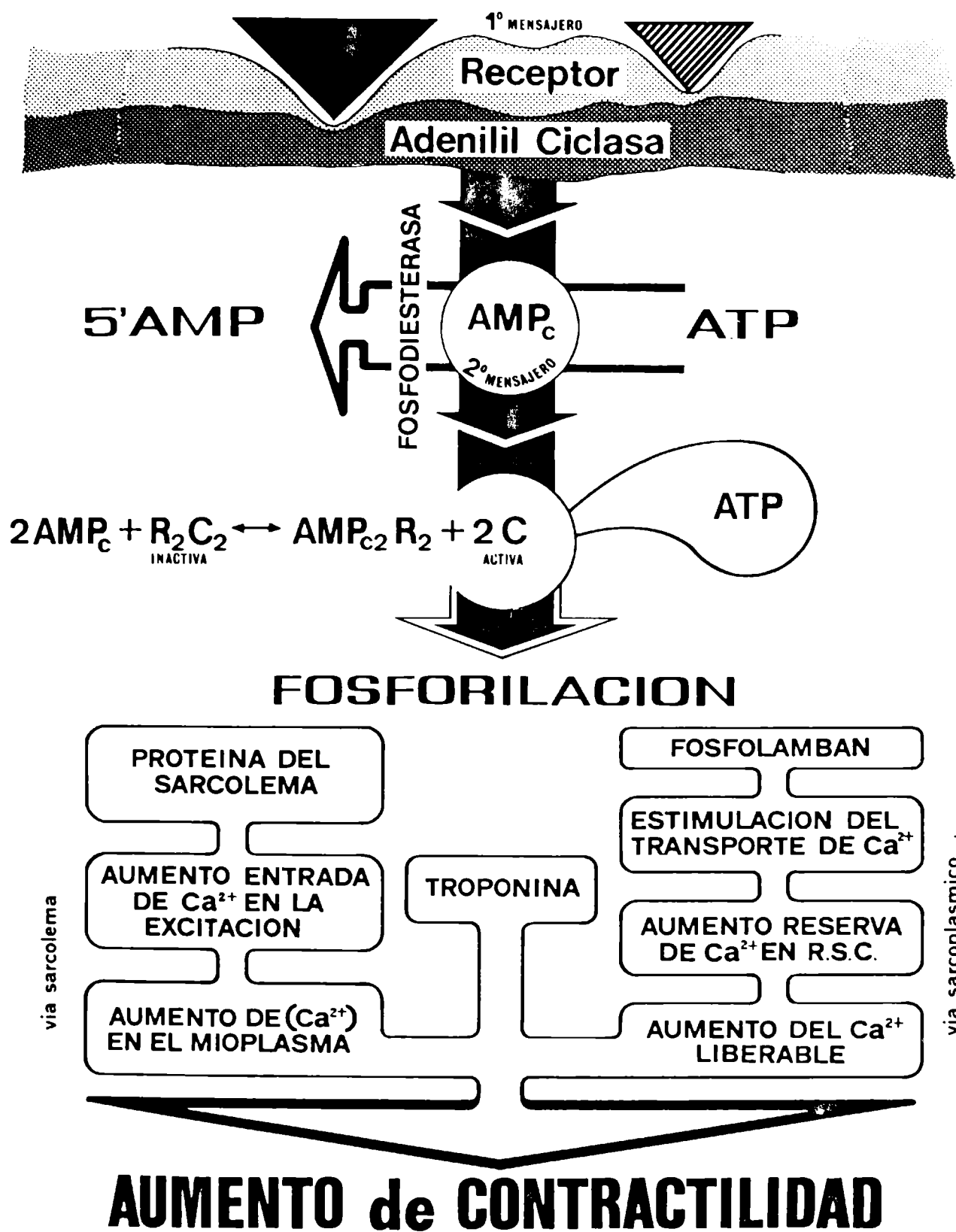


Figura 2: Representación esquemática de los sitios de acción de la proteína quinasa AMPc dependiente y del mecanismo por el cual se desarrolla el efecto inotrópico positivo.

Se ha detectado actividad de proteína quinasa AMPc-dependiente endógena tanto en preparaciones enriquecidas en sarcolema (72-73) como en preparaciones enriquecidas en retículo sarcoplásmico miocárdicos (74-76).

La presencia de proteínas fosforiladas por acción de la proteína quinasa AMPc-dependiente se ha detectado en sarcolema (72) y en el retículo sarcoplásmico (67,77), lo que sugiere que el AMPc es capaz de regular el flujo de calcio a ambos niveles por el mismo mecanismo. La proteína fosforilada en retículo sarcoplásmico se ha denominado fosfolambán. Las proteínas involucradas funcionalmente en el proceso contráctil son cuatro: actina, miosina, tropomiosina y troponina, de las cuales la troponina es fosforilada por acción de la proteína quinasa AMPc-dependiente. La miosina, localizada en el filamento grueso del sarcómero, es un complejo formado por dos cadenas polipeptídicas grandes, denominadas cadenas pesadas y 4 péptidos pequeños denominados cadenas livianas. Las cadenas pesadas, denominadas cola de la miosina, adoptan en su mayoría estructura de α hélice lo que confiere rigidez a la molécula, mientras que el resto adopta conformación globular y constituye lo que se denomina cabeza de la miosina donde se asocian las cadenas livianas. La cabeza de la miosina se une a la actina y desarrolla la actividad de ATPasa. Las cadenas livianas son esenciales para la actividad enzimática e incluso estarían regulando la interacción actina-miosina durante el ciclo de contracción-relajación. Actina, es una proteína globular altamente simétrica formada por unidades monoméricas que se repiten constituyendo el filamento fino del sarcómero. Su función es la de activar la actividad de ATPasa de la miosina cuando se le une.

Actina y miosina son las denominadas propiamente proteínas contráctiles, mientras que tropomiosina y troponina son las proteínas reguladoras.

Tropomiosina regula la interacción entre actina y miosina en presencia de troponina y da rigidez al filamento fino. Adquiere importancia biológica al unirse a la actina, ya que desarrolla su capacidad moduladora, ya sea inhibiéndola o activándola.

Troponina está formada por 3 subunidades distintas denominadas troponina I (TN-I), troponina C (TN-C) y troponina T (TN-T). La TN-I, se une a la actina e inhibe la actividad ATPasa del complejo actomiosina, la TN-T se une a la tropomiosina y la TN-C une calcio y regula que la TN-I se una a la actina.

Las primeras observaciones sobre fosforilación de proteínas de los miofilamentos mediada por la proteína quinasa - AMPc-dependiente se llevaron a cabo en músculo esquelético (78). Posteriormente se demostró en músculo cardíaco que tanto la troponina purificada como el complejo troponina-tropomiosina purificados eran fosforilados por la proteína quinasa AMPc-dependiente (79). Cole y Perry (80) demostraron que la proteína quinasa AMPc-dependiente catalizaba la fosforilación de la subunidad I de la troponina aislada y purificada y England (69, 73) lo demostró en corazón intacto. Trabajando en corazón de rata perfundido encontró que simultáneamente con el aumento de la contractilidad provocado por la perfusión con epinefrina se fosforilaba la subunidad I de la troponina. Estos resultados indican claramente que efectivamente la fosforilación de la TN-I ocurre en el miocardio intacto como una consecuencia de la estimulación del receptor β y del consiguiente incremento en los niveles intracelulares de AMPc, pero cómo se regula el estado contráctil del miocardio a través de dicha fosforilación aún no ha sido resuelto.

4.- Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos

La importancia de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos en la regulación de los niveles intracelulares de dichos nucleótidos, ha sido considerada desde años atrás a raíz de los experimentos realizados "in vitro" con inhibidores o activadores de las mismas. La implicancia de las fosfodiesterasas como participantes activas en la regulación de los procesos biológicos se confirma por el hallazgo de las múltiples formas de la enzima con distintas propiedades cinéticas, en las distintas especies y tejidos.

La actividad de fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos fue descrita por Sutherland y Rall, quienes además demostraron que dicha actividad podía ser inhibida por cafeína y otras metilxantinas (2). Las fosfodiesterasas catalizan la hidrólisis de los nucleótidos cíclicos, AMPc y GMPc a 5' AMP y 5' GMP respectivamente (83-86).

De acuerdo a estudios realizados en extractos sonificados de corazón, se evidencia la existencia de tres fracciones proteicas con actividad de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos. Es decir que la fosfodiesterasa no es una enzima con propiedades físicas y cinéticas homogéneas, sino que hay más de una forma de la enzima. Aunque en corazón no han sido purificadas las distintas formas a homogeneidad, los estudios cinéticos realizados revelaron la existencia de las 3 enzimas mencionadas:

1.- Fosfodiesterasa de GMPc

Esta enzima tiene gran afinidad por el GMPc, es activada por Ca^{+2} más un factor proteico denominado "calmodulina" (87-88). Se ha descrito cinéticamente como una enzima con baja afinidad por el AMPc y alta afinidad por el GMPc (89-93). La hidrólisis del GMPc se inhibe competitivamente por el AMPc y viceversa (94-96).

2.- Fosfodiesterasa de AMPc

Esta enzima tiene gran afinidad por el AMPc, aparece asociada a membranas y puede ser liberada por -sonicación (97-100).

3.- Fosfodiesterasa de Nucleótidos Cíclicos

Esta fosfodiesterasa miocárdica es cinéticamente -distinta de las otras dos formas anteriores. Cataliza la hidrólisis de ambos nucleótidos cíclicos, AMPc y GMPc, con afinidades similares. Bajas concentraciones de GMPc estimulan la hidrólisis del -AMPc, pero no lo contrario. El GMPc actuaría como activador alostérico de la enzima (99,101-103).

Se desconoce la importancia relativa de cada forma de la enzima en el músculo cardíaco. La función de las fosfodiesterasas es la de inactivar los nucleótidos cíclicos para reestablecer sus niveles normales ante cualquier cambio provocado por un estímulo y revertir la serie de eventos celulares que -los mismos producen.

Desde que se describió que las metilxantinas inhiben -la hidrólisis del AMPc (2,82), estos agentes han sido estudiados por su efecto inhibitorio sobre las fosfodiesterasas. Se -han usado como agentes capaces de potenciar el efecto de estimuladores de la adenil o guanil ciclasa y se ha demostrado que potencian la respuesta mecánica y metabólica de los agonistas beta (24,104-105). También se han utilizado para potenciar el efecto del AMPc o GMPc exógenos o directamente como inhibidores de las fosfodiesterasas en estudios sobre, adenil o guanil ciclasa e incluso sobre proteínas quinasas AMPc-dependientes. Algunos autores (31,41,106) han cuestionado los hallazgos de -los estudios con metilxantinas a causa de las concentraciones relativamente altas requeridas para que causen efecto, además, dichas drogas producen otros efectos distintos al de inhibir -las fosfodiesterasas. Por ejemplo se ha postulado que las metilxantinas afectan el metabolismo del calcio en la célula miocárdica (107-108), que producen efecto inotrópico positivo de

por sí (41,106) y que provocan la liberación de catecolaminas endógenas (109). Los inhibidores de las fosfodiesterasas al elevar los niveles intracelulares de AMPc deberían producir efectos similares a los de las catecolaminas, sin embargo, se ha reportado para una variedad de inhibidores la falta de correlación entre la inhibición de las fosfodiesterasas y el efecto inotrópico positivo (110).

Teofilina, (1,3-dimetilxantina), es uno de los agentes inhibidores de las fosfodiesterasas más extensivamente estudiados. En experimentos realizados "in vitro" a concentraciones milimolares de AMPc, teofilina se comporta como un inhibidor competitivo de la enzima de corazón bovino (82). En preparaciones de aurículas de cobayo produce incrementos en los niveles de AMPc que preceden al efecto inotrópico (111). Por otro lado cuando se inyecta en corazones perfundidos de cobayo produce un modesto efecto inotrópico positivo sin incremento de niveles de AMPc (112-113). En músculo papilar de gato no se detectaron cambios mecánicos luego de la administración de teofilina (41)

Pentoxifilina [3,7-dimetil-1-(5-oxohexyl)xantina] es un nuevo agente usado como inhibidor de las fosfodiesterasas pertenecientes al grupo de las metilxantinas (114-115). Se ha demostrado su efecto inhibitorio en fosfodiesterasa aislada de cerebro de rata, corazón bovino y de distintos órganos de cobayo (116). Actúa como inhibidor competitivo de la fosfodiesterasa de corazón bovino, es más soluble en agua y su efecto es más prolongado que el de teofilina (115). Además de las metilxantinas otro agente inhibidor de la fosfodiesterasa corrientemente empleado es papaverina. Se ha descrito que papaverina incrementa los niveles intracelulares de AMPc miocárdico (25) pero los resultados respecto a sus efectos sobre la contractilidad son inconsistentes. Se ha reportado que produce efecto inotrópico positivo en corazones de cobayo (110,25) y en músculo papilar de conejo (117,26). Además, potencia la respuesta inotrópica y el incremento en los niveles de AMPc debido a la administración de isoproterenol en músculo papilar de conejo (26). En contraposición con estos estudios otros autores han detectado incrementos en los niveles de AMPc sin cambios en la contractilidad luego de la administración de la droga (88,118) y dosis altas producen efecto inotrópico negativo (26).

Papaverina tiene mayor potencia inhibitoria que teofilina y actúa como inhibidor de fosfodiesterasas de varios tejidos, inhibiendo ambas formas de la enzima para AMPc (119). En

corazones de rata se ha demostrado que papaverina también inhibe la hidrólisis del GMPc a altas y bajas concentraciones del sustrato (120). En miocardio, papaverina actúa como inhibidor competitivo o no competitivo dependiendo del grado de purificación de la enzima (121).

5.- GMPc y contractilidad

Guanil Ciclasa

La formación de GMPc es catalizada por la guanil ciclasa (122-126). A diferencia de la adenil ciclasa miocárdica que se encuentra asociada a membranas, la guanil ciclasa se ha hallado en las dos formas, particulada y soluble (122,125). Ambas formas presentan propiedades enzimáticas diferentes, altas concentraciones de calcio inhiben la guanil ciclasa particulada, mientras que debilmente estimulan la guanil ciclasa soluble.

Para la guanil ciclasa no ha sido posible establecer la relación hormona receptor como para la adenil ciclasa debido a la imposibilidad de lograr la estimulación in vitro de la enzima por hormonas o drogas (128), aunque recientemente se ha reportado que dos agonistas muscarínicos, acetilcolina y carba^{col}, estimulan la actividad de guanil ciclasa asociada con preparaciones de sarcolema (124).

GMP cíclico

El rol del GMPc como regulador de la contractilidad cardíaca fue sugerido por George y colaboradores (129-130), quienes encontraron que en corazón de rata perfundido con acetilcolina se producía un aumento en los niveles de GMPc simultáneo con una disminución de la fuerza de contracción y una disminución de la frecuencia. Si bien los niveles de AMPc en el miocardio disminuyen con la administración de acetilcolina, este cambio no se correlaciona con los efectos cronotrópico e inotrópico negativos. Otros autores han demostrado que la administración de acetilcolina en ventrículos aislados de cobayo aumenta los niveles de GMPc pero no se detectan cambios en la contractilidad ni en los niveles de AMPc (131). Los derivados del GMPc producen efecto inotrópico negativo en el miocardio, el dibutiril-GMPc atenúa el efecto inotrópico positivo producido por el isoproterenol en el corazón perfundido de cobayo (131) y en músculo papilar de gato, el monobutiril-GMPc antagoniza la acción del dibutiril AMPc (36). No está claramente establecido el rol del GMPc como mediador de los efectos mecánicos y metabólicos en el miocardio. Con los estudios realizados hasta el presente y con la purificación de la proteína quinasa GMPc-dependiente es posible puedan ser elucidados los mecanis-

mos bioquímicos por los cuales el GMPc produce sus efectos y se establezca así el rol del sistema parasimpático en la regulación directa del estado contráctil del miocardio como ha sido establecido para el simpático respecto a la producción de AMPc (132).

Por inmunocitoquímica se ha demostrado que en el miocardio de rata el GMPc se halla asociado a las bandas A de miosina (127), este hallazgo sugiere un papel para el GMPc en la actividad de la miosina, aunque las evidencias bioquímicas todavía no han sido demostradas.

6.- Proteína quinasa GMPc-dependiente

En analogía con la observación de que el AMPc ejerce sus efectos a través de la activación de la proteína quinasa AMPc-dependiente, Kuo y Greengard (5) propusieron que la proteína quinasa GMPc-dependiente media los efectos del GMPc. La proteína quinasa GMPc-dependiente se aisló primeramente de músculo de langosta (133-135) y posteriormente de mamíferos.

Aunque los estudios iniciales realizados con enzima parcialmente purificada de langosta revelaron que la proteína quinasa GMPc-dependiente estaba formada por dos subunidades distintas, una regulatoria que unía GMPc y otra catalítica que catalizaba la transferencia del fosfato γ del ATP a sustratos proteícos (136), estudios más recientes realizados con proteína quinasa GMPc-dependiente aisladas de pulmón bovino indican que es una holoenzima compuesta por dos subunidades idénticas (137).

La reacción de activación de la proteína quinasa GMPc-dependiente puede expresarse por la siguiente ecuación:



Es decir que la enzima requiere 2 moles de GMPc para su activación, que no promueve disociación de las subunidades que la componen (138).

Se ha descrito que la enzima cataliza su autofosforilación (139), que fosforila enzimas del metabolismo de glúcidos y lípidos (140-141) e incluso a la troponina I en el mismo sitio que es fosforilada por la proteína quinasa AMPc-dependiente (142-143) aunque con mucho menor velocidad (143-144) lo que podría explicar porqué el incremento en los niveles de GMPc en corazón de rata perfundido no está asociado a la fosforilación de la troponina (81).

II.- OBJETIVOS

El presente trabajo se realizó para aportar información sobre el comportamiento contráctil del miocardio frente a los agentes inhibidores de las fosfodiesterasas de nucleótidos - cíclicos y su relación con dichos nucleótidos.

Se decidió investigar la interacción entre los niveles - intracelulares de AMPc y GMPc y la actividad de la proteína - quinasa AMPc-dependiente luego de la administración de los inhibidores de las fosfodiesterasas en corazón de rata aislado y perfundido, debido a los resultados contradictorios previamente descriptos para dichos inhibidores en diferentes especies (41,84-85,104-105,118,145-147). Como así también para - tratar de esclarecer el rol del GMPc en la mecánica cardíaca ya que se ha sugerido que dicho nucleótido modula el efecto - inotrópico positivo del AMPc (71,130-131,143,148-154).

III.- MATERIAL Y METODOS

1.- Perfusión de los corazones

Los corazones de rata fueron perfundidos de acuerdo a la técnica de Langendorff (155). Se usaron ratas blancas de 250 a 350 g de peso anestesiadas con pentobarbital sódico - (80 mg/kg) por vía intraperitoneal. Se aislaron los corazones y se les introdujo una cánula en la aorta que permitió la perfusión a través de las coronarias, latiendo el corazón sin desarrollar trabajo externo. Se colocaron en un equipo diseñado para permitir el cambio instantáneo de la perfusión con la solución control a la perfusión con la solución experimental.

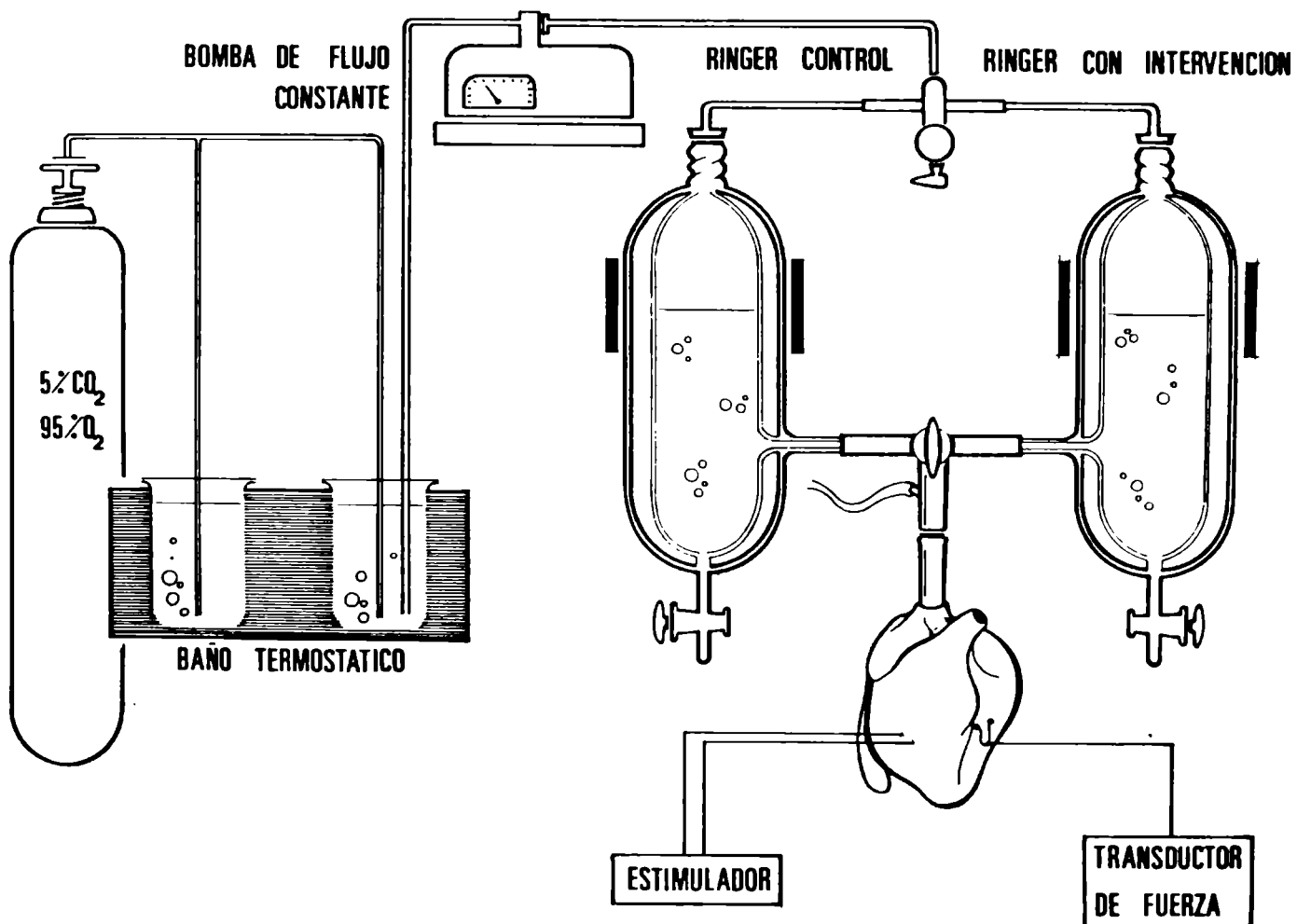


Figura 3: Esquema del equipo de perfusión.

Las principales condiciones que caracterizaron este preparado son: solución de perfusión equilibrada con una mezcla gaseosa de 5% de CO_2 en O_2 y a temperatura constante de 37°C por termostatización; flujo coronario cercano a 9 ml/min, con mínima variación para cada preparado individual, mediante una bomba de flujo constante y presión de perfusión entre 40 y 100 mm de Hg.

La frecuencia espontánea de los corazones se reduce mediante el pinzamiento del tabique interauricular hasta lograr mediante el bloqueo, una disminución de los latidos a 80 por minuto o menos. Dos electrodos suturados a la pared ventricular derecha y conectados a un estimulador electrónico - permiten hacer llegar al corazón pulsos cuya frecuencia se fija en 200 pulsos/min, es decir, que la perfusión se realiza a frecuencia constante.

A la pared del ventrículo izquierdo se sutura un arco de "Strain-Gauge"; el segmento de fibras ventriculares unidas a las dos ramas del arco desarrolla fuerza durante la contracción que puede considerarse como de tipo "isométrico". La señal del transductor de fuerza se amplifica y recoge con un registrador Sanborn modelo 7700, equipado con preamplificadores modelo 350-1100C, como una curva de tensión (T). En un segundo canal se registra la primera derivada de la tensión con respecto al tiempo (\dot{T}) que se obtiene haciendo pasar la señal del transductor de fuerza por un derivador electrónico. Ambas señales son registradas a una velocidad de corrida del papel de 50 ó 100 mm/seg.

Los corazones se perfunden con solución de Krebs-Ringer bicarbonato de la siguiente composición: Cloruro de sodio: 128.3 mM; Cloruro de potasio: 4.7 mM; Cloruro de calcio: 1,35mM; Cloruro de magnesio: 1,1 mM; Bicarbonato de sodio: - 20,2 mM; fosfato diácido de sodio: 0,4 mM; glucosa: 11,1 mM; EDTA: 15 mg/l; a pH 7,40 y a una PCO_2 de 40 mmHg. La perfusión se realiza durante un período de 30 minutos para lograr la estabilización del preparado, seguido de un período adicional de uno o 15 minutos con la misma solución (grupo control) o con el agregado al medio de perfusión de los agentes inhibidores de la fosfodiesterasa usados: papaverina 10^{-5} M; teofilina - 2×10^{-4} M y pentoxifilina 10^{-4} M. Las dosis usadas se eligieron en base a informaciones previas (118) y a ensayos preliminares en los cuales se midió su capacidad para incrementar la actividad de la proteína quinasa AMPc-dependiente. Al finalizar el período de perfusión (1 ó 15 minutos) los corazones inmediatamente se congelan en nitrógeno líquido con pinzas Wollenberger (156) que han sido previamente enfriadas en dicho nitrógeno.

Las aurículas y grandes vasos se desechan y el tejido correspondiente al ventrículo izquierdo se pulveriza finalmente en un mortero previamente enfriado en nitrógeno líquido y se guarda a -70°C hasta el momento de realizar las determinaciones bioquímicas.

El análisis de los registros de la actividad mecánica permite evaluar los siguientes parámetros: tensión desarrollada (T), velocidad máxima de desarrollo de la fuerza o velocidad máxima de contracción ($+\dot{T}$); velocidad máxima de caída de la fuerza o velocidad máxima de relajación ($-\dot{T}$) y el tiempo en el cual se alcanza la máxima tensión desarrollada o tiempo hasta la tensión pico (TTP). Los valores obtenidos para los parámetros mecánicos estudiados se expresan como diferencias porcentuales respecto de su valor al minuto 30 del período de estabilización, cero de intervención.

Los valores representan media \pm E.S.. Las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) se obtuvieron por el test de "t" de Student para muestras apareadas, comparando los valores del tiempo cero con aquellos obtenidos luego de 1 ó 15 minutos de perfusión.

2.- Determinación de actividad de proteína quinasa AMPc-dependiente

La determinación de la actividad de la proteína quinasa AMPc-dependiente se llevó a cabo como lo describen Corbin y Reimann (58), en aproximadamente 50 mg de tejido pulverizado, el cual se suspendió a 4°C en 0,75 ml de buffer fosfato de potasio 10 mM con EDTA 10 mM y teofilina 0.5 mM a pH 6,8. La suspensión se homogeniza y el homogenato se centrifuga a 12.000 g por 20 minutos a 4°C. En la fracción sobrenadante se determina la actividad de proteínaquinasa AMPc-dependiente midiendo la incorporación de ^{32}p a partir de ATP - γ - ^{32}p a Histona, sin y con agregado de AMPc 2 μM .



La reacción se inicia con el agregado de 20 μl del sobrenadante a 50 μl del medio de incubación. Dicho medio es una solución 17 mM de fosfato de potasio (pH 6,8), 0,33 mM - ATP - γ - ^{32}p (aprox. 35 cpm/pmol), 6 mM acetato de magnesio y 0,5 mg de Histona con o sin AMPc 2 μM . La incubación se lleva a cabo a 30°C durante 5 minutos y se finaliza pipeteando una alícuota de 50 μl de la mezcla de reacción a un papel de filtro de 1 x 2 cm, que se sumerge inmediatamente en ácido tricloroacético 10% (10 ml/papel) a 4°C. El papel de filtro se lava según el método de Wastila y colaboradores (157) y su radioactividad se mide en 10 ml de líquido de centelleo tolueno cellosolve.

La actividad de proteína quinasa AMP-dependiente se expresa como cociente de actividades, (-cAMP/+cAMP), es decir, cociente de actividades sin y con agregado de AMPc 2 μ M para lograr la máxima activación de la proteína quinasa AMPc-dependiente (45).

Los valores representan la media \pm E.S.. Las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) se obtuvieron por el test de "t" de Student para muestras independientes, - comparando los valores de los grupos controles al minuto 0 a - los 15 minutos con el de cada intervención farmacológica en el mismo período.

3.- Determinación de niveles de nucleótidos cíclicos: AMPc y GMPc

Para determinar niveles de AMPc, aproximadamente 10 mg del tejido congelado y pulverizado se homogenizaron a 4°C en 1 ml de ácido tricloroacético al 6%, con H3-AMPc (aproximadamente 4000 cpm) para determinar recuperación luego de la extracción. El homogenato se centrifuga a 2500 g a 4°C durante - 15 minutos y la fracción sobrenadante se extrae 4 veces con 5 volúmenes de eter etílico saturado con vapor de agua. El extracto etéreo se evapora a sequedad durante 5 minutos en un baño termostático a 80°C con arrastre por corriente de aire.

El mismo procedimiento se sigue para determinar niveles de GMPc, usando aproximadamente 50 mg de tejido congelado y pulverizado que se homogenizaron en 300 μ l de ácido tricloroacético al 6% con GMPcH³ (aproximadamente 1500 cpm) como marcador.

En ambos casos el extracto seco se resuspende en un ml de buffer acético-acetato de sodio 0,05 M pH 6,2 y en una alícuota del mismo se determina el contenido de AMPc o GMPc, - previa acetilación de la muestra (158) por radioinmuno ensayo según una modificación del método de Steiner y colaboradores - (159).

La especificidad del método permite la determinación de los niveles de AMPc y GMPc sin purificación cromatográfica del extracto de tejido (149,160). El radioinmuno ensayo se basa en la competición por un determinado número fijo de sitios de anticuerpo entre el antígeno frío y el antígeno marcado.

Cantidades crecientes de antígeno frío (standards o muestras) para un número fijo de sitios de anticuerpo y de antígeno marcado, resulta en una cantidad decreciente de comple-

jo anticuerpo-antígeno marcado. Esta relación se expresa como una curva standard donde por interpolación se determina el contenido de AMPc o GMPc de las muestras. Las curvas standards empleadas abarcan un rango de 0,0025 a 0,50 picomoles/tubo de ensayo.

Los resultados obtenidos se expresan en picomoles/mg de tejido húmedo para AMPc y en femtomoles/mg de tejido húmedo para GMPc. Los valores representan la media \pm ES y las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) se obtuvieron - por el test de "t" para muestras independientes comparando los valores del grupo control a un tiempo dado (1 min. ó 15 min.) con los correspondientes a cada grupo experimental.

IV.- RESULTADOS1.- Grupo control

Se realizaron 15 experimentos control de un minuto - ($n = 15$) y 17 de 15 minutos de perfusión ($n = 17$). No se observaron cambios significativos en los parámetros mecánicos - durante los 30 minutos del período de estabilización como así tampoco durante uno ó 15 minutos de perfusión.

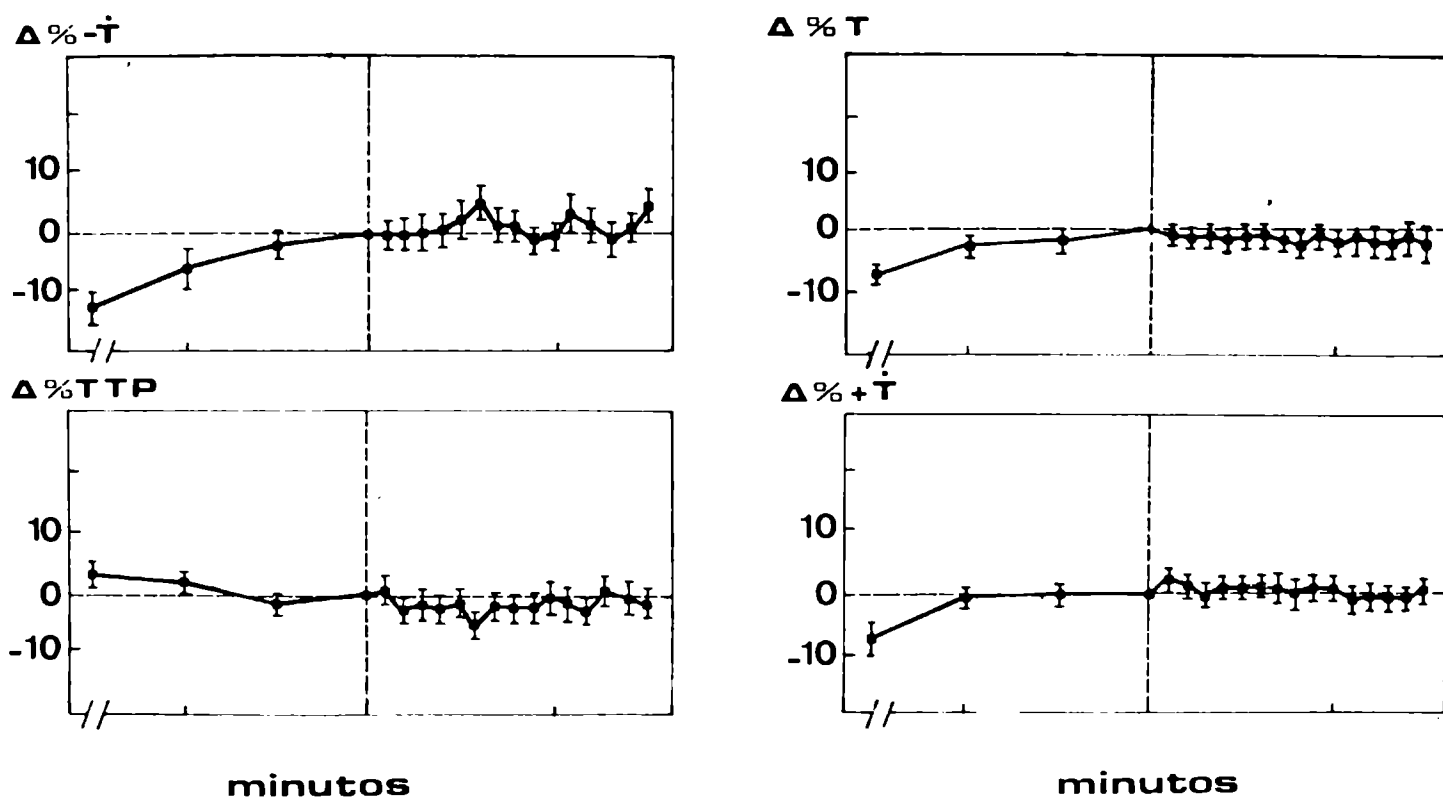
CONTROL

Figura 4: Transcurso en el tiempo de la actividad mecánica de los corazones control o controles. Los parámetros - mecánicos analizados fueron: tensión desarrollada - (T), velocidad máxima de desarrollo de la fuerza - ($+\dot{T}$), velocidad máxima de relajación ($-\dot{T}$) y tiempo hasta la tensión pico (TTP). No se detectaron cambios en el comportamiento contráctil durante los 30 minutos de período de estabilización ni durante los 15 minutos de perfusión con solución Ringer control. Los datos representan la media \pm ES de las diferencias porcentuales respecto de su valor al minuto 30 del período de estabilización.

Los valores obtenidos para los parámetros mecánicos, luego de un minuto de perfusión fueron: (T): $0,94 \pm 1,96\%$; - (+ \dot{T}): $2,57 \pm 2,32\%$; (- \dot{T}): $2,27 \pm 3,63\%$; (TTP): $3,30 \pm 1,89\%$ - (2 ± 1 mseg).

En los corazones controles de 15 minutos de perfusión se obtuvieron los siguientes valores: (T): $-0,20 \pm 2,24\%$; (+ \dot{T}): $1,09 \pm 1,98\%$; (- \dot{T}): $5,86 \pm 3,01\%$; (TTP): $-1,61 \pm 1,80\%$ (1 ± 1 mseg).

Los valores obtenidos para los parámetros bioquímicos se muestran en la figura.

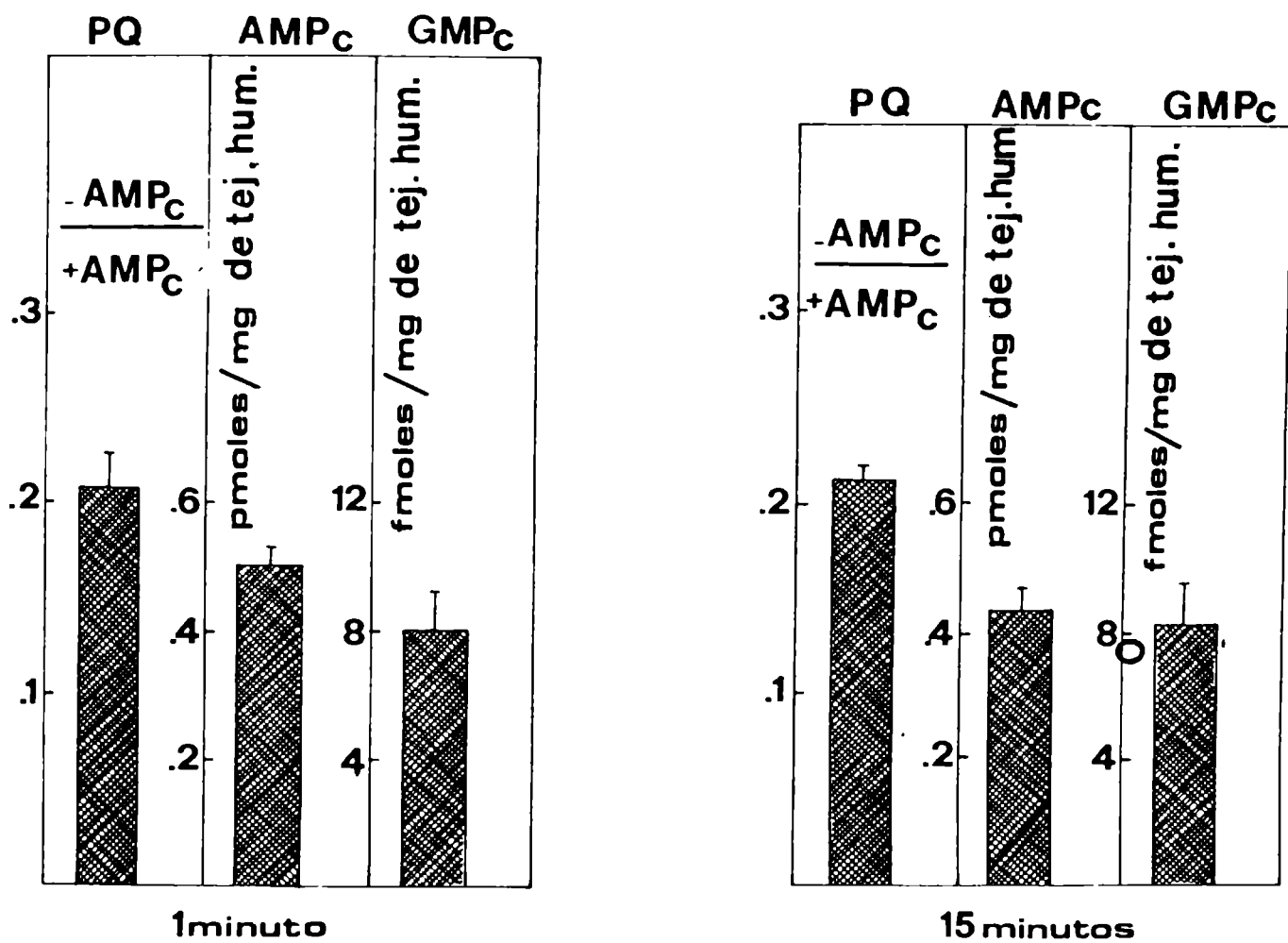


Figura 5: Cociente de actividades de la proteína quinasa AMPc dependiente y niveles intracelulares de AMPc y GMPc en los corazones control luego de uno y 15 minutos de perfusión. Los datos representan la media \pm ES.

En 12 experimentos controles con un minuto de perfusión se obtuvieron los siguientes resultados: AMPc, $0,503 \pm 0,025$ picomoles/mg de tej. húmedo; GMPc, $8,1 \pm 1,2$ femtomoles/mg de tej. húmedo y cociente de actividades de proteína quinasa AMPc-dependiente, $0,21 \pm 0,02$.

Cuando los corazones fueron congelados luego de 15 minutos de perfusión, los valores hallados para 12 experimentos control fueron: AMPc $0,452 \pm 0,031$ picomoles/mg de tej. húmedo; GMPc, $8,2 \pm 1,2$ femtomoles/mg de tej. húmedo y el cociente de actividades de la proteína quinasa AMPc-dependiente de $0,21 \pm 0,01$.

2.- Efectos de la perfusión con Teofilina 2×10^{-4} M

La figura 6 muestra los resultados del comportamiento mecánico de los experimentos en las cuales los corazones fueron perfundidos con teofilina, durante uno (n=8) y 15 (n=12) minutos respectivamente.

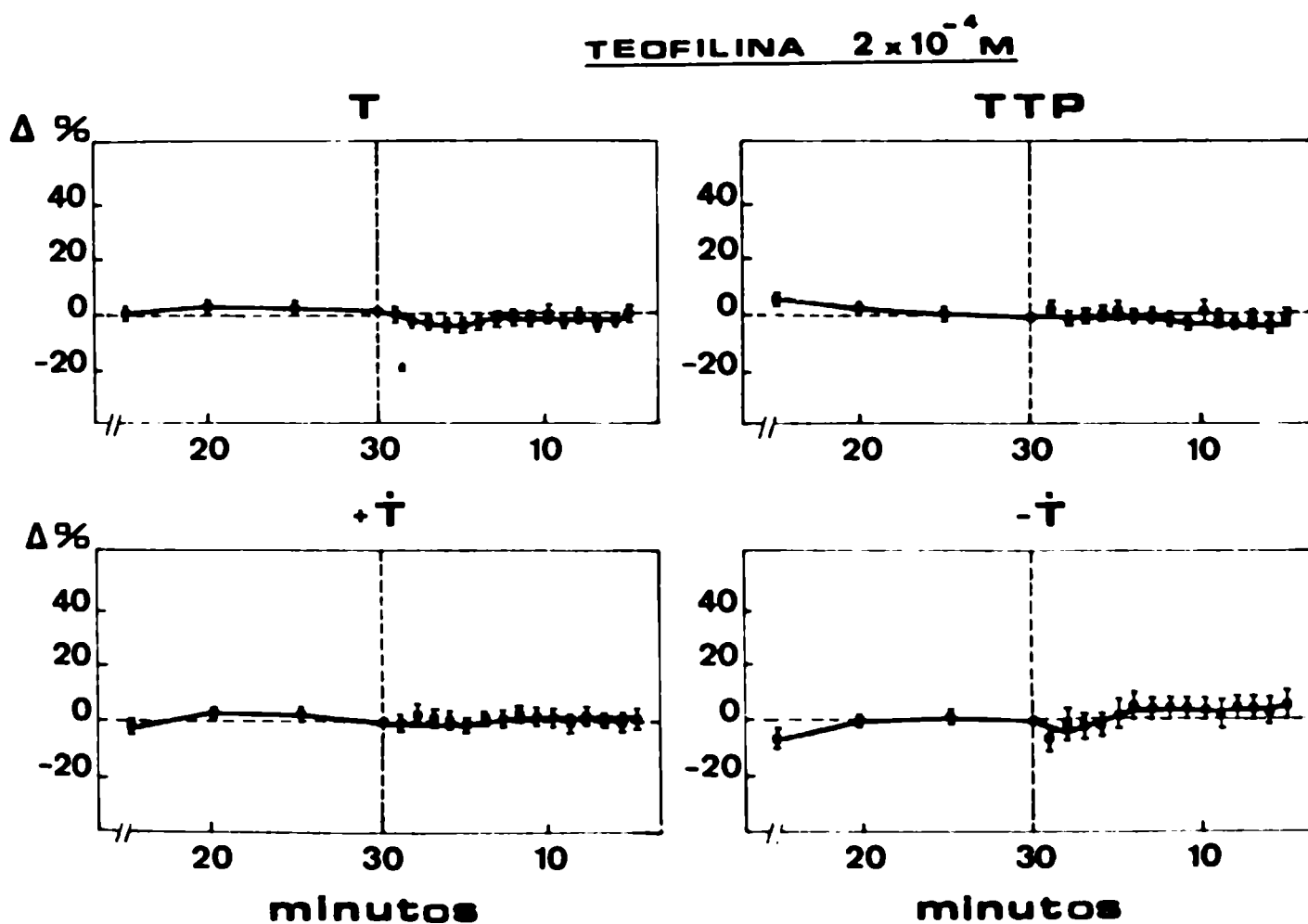


Figura 6: Luego de los 30 minutos del período de estabilización los corazones se perfundieron durante uno y - 15 minutos con solución Ringer a la cual se le agregó teofilina 2×10^{-4} M. Como se observa no se registraron cambios en los parámetros mecánicos por la perfusión con teofilina.

Luego de la intervención con teofilina no se detectó ningún cambio en los parámetros mecánicos T; $+\dot{T}$; $-\dot{T}$ y TTP tanto al - minuto como a los 15 minutos de perfusión.

Los niveles de nucleótidos cíclicos, AMPc y GMPc, como el cociente de actividades de la proteína quinasa AMPc-dependiente, luego de uno y 15 minutos de perfusión con la droga se muestran en la figura.

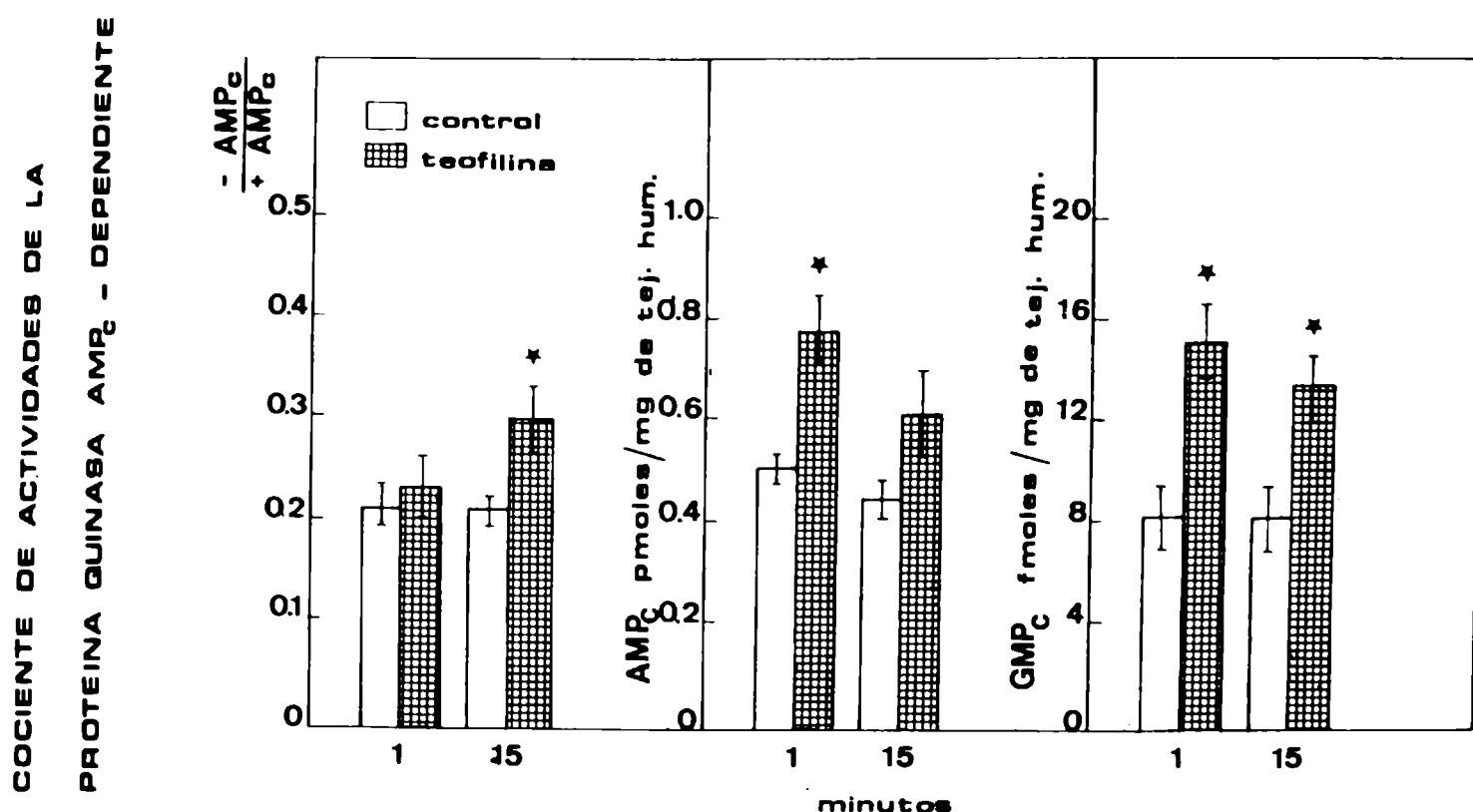


Figura 7: Niveles de nucleótidos cíclicos y cociente de actividades de la proteína quinasa AMPc dependiente en corazones control y luego de uno y 15 minutos de perfusión con teofilina. Los datos representan la media \pm ES. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

Al minuto de intervención los niveles de AMPc alcanzaron un aumento estadísticamente significativos de $0,773 \pm 0,062$ picomoles/mg de tej. húmedo ($n=5$), mientras que el cociente de actividades de la proteína quinasa AMP-dependiente si bien se elevó a $0,23 \pm 0,03$ ($n=8$), dicho incremento no fue estadísticamente significativo. Luego de 15 minutos de perfusión el cociente de actividades de la proteína quinasa AMPc-dependiente se incrementó a $0,30 \pm 0,03$ ($n=12$), siendo la diferencia encontrada estadísticamente significativa, mientras que los niveles de AMPc no revelaron cambios estadísticamente significativos, siendo el valor obtenido para los mismos de $0,613 \pm 0,084$ picomoles/mg de tej. húmedo ($n=8$).

Los niveles de GMPc se incrementaron significativamente tanto al minuto como a los 15 minutos de perfusión, siendo los valores hallados de $15,0 \pm 1,4$ (n=5) y $13,2 \pm 1,3$ (n=7) - femtomoles/mg de tej. húmedo respectivamente.

3.- Efectos de la perfusión con Papaverina 10^{-5} M

En la figura 8 se muestra el registro de la actividad mecánica de un experimento tipo luego de uno y 15 minutos de perfusión con papaverina. Los efectos producidos sobre la mecánica cardíaca son pequeños y de corta duración. En 13 experimentos de un minuto de perfusión la tensión desarrollada se incrementó en $9 \pm 3\%$, la máxima velocidad de contracción en $-19 \pm 3\%$ y la máxima velocidad de relajación en $18 \pm 3\%$; el tiempo hasta la tensión pico decreció en $6 \pm 2\%$ (4 ± 1 mseg), siendo todos los cambios detectados estadísticamente significativos.

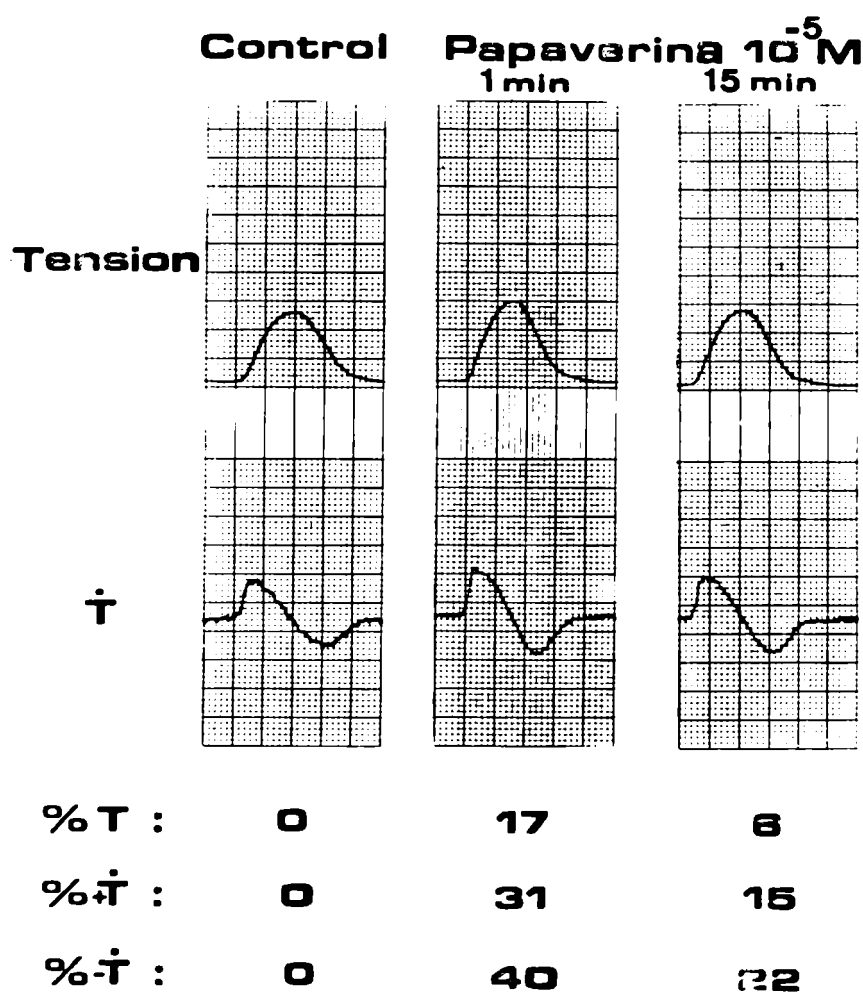


Figura 8: Registro de un experimento tipo mostrando la tensión desarrollada y su primera derivada con respecto al tiempo antes y después de la infusión de papaverina 10^{-5} M. Velocidad de corrida del papel 100 mm/seg. Se registró un cambio pequeño pero estadísticamente significativo al minuto de perfusión.

En un grupo de 5 experimentos en los cuales los corazones fueron deplecionados de catecolaminas por inyección de reserpina (5 mg/kg de peso) 24 horas antes de ser perfundidos con papaverina, se detectaron esencialmente los mismos cambios pequeños y transitorios en la actividad mecánica.

El contenido de norepinefrina en los animales controles fue de $0,207 \pm 0,025 \mu\text{g/g}$ de tej. húmedo, mientras que en los reserpinizados de $0,016 \pm 0,009 \mu\text{g/g}$ de tej. húmedo. Los valores obtenidos para los parámetros mecánicos de los animales reserpinizados luego de un minuto fueron: (T): $19 \pm 9\%$; ($+\dot{T}$): $26 \pm 14\%$; ($-\dot{T}$): 16 ± 8 y (TTP): $7 \pm 3\%$.

Luego de 15 minutos de perfusión con papaverina no se detectaron cambios significativos en la mecánica cardíaca. Los resultados promedios de 8 experimentos se muestran en la figura.

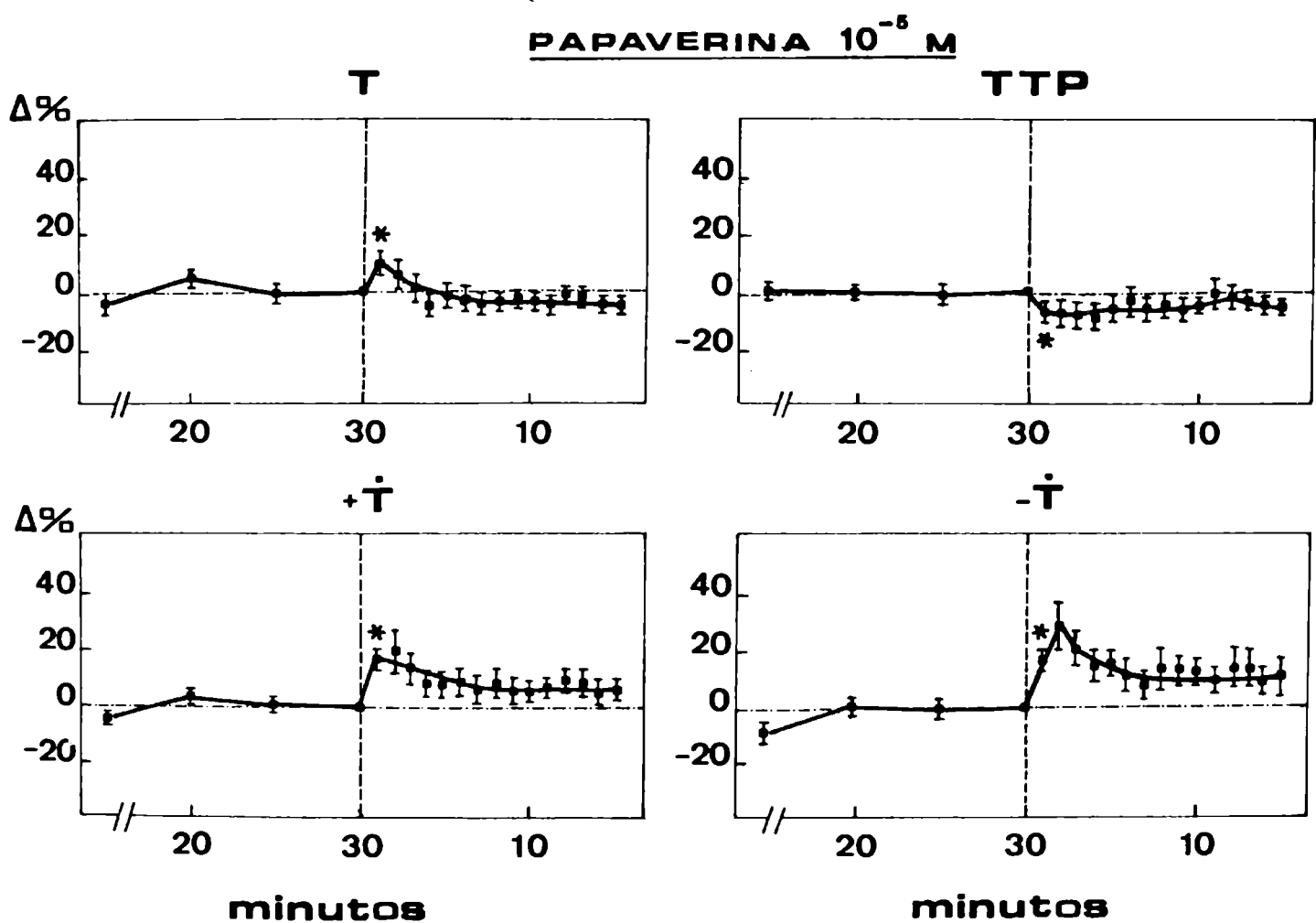


Figura 9: Transcurso en el tiempo de la actividad mecánica de los corazones perfundidos con papaverina 10^{-5} M. Se detectaron cambios pequeños pero estadísticamente significativos al minuto de intervención

Papaverina incrementó significativamente los niveles de AMPc a $0,784 \pm 0,077$ (n=11) y $0,762 \pm 0,064$ (n=6) picomoles/mg de tej. húmedo, al minuto y 15 minutos respectivamente.

El cociente de actividades de la proteína quinasa - AMPc dependiente se incrementa a $0,23 \pm 0.03$ (n=13) y $0,31 \pm 0.03$ (n=8) luego de uno y 15 minutos, siendo el último incremento estadísticamente significativo.

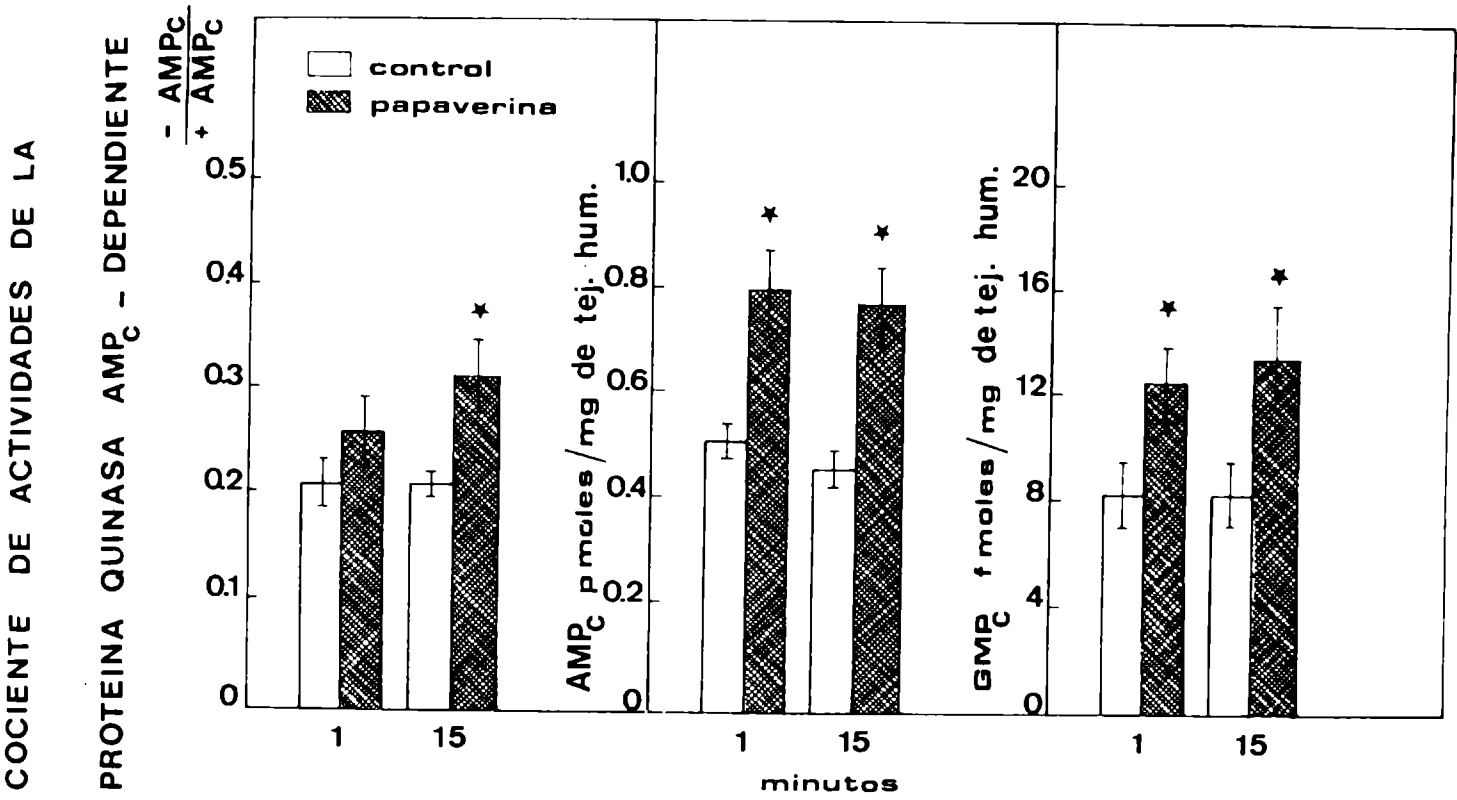


Figura 10: Cambios detectados en los parámetros bioquímicos luego de uno y 15 minutos de perfusión con papaverina. Los valores representan la media \pm ES. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

Incrementos estadísticamente significativos para los niveles de GMPc se detectaron tanto al minuto como a los 15 minutos de perfusión siendo los valores hallados de $12,3 \pm 1,4$ (n=8) y $13,3 \pm 1,9$ (n=7) femtomoles/mg de tej. húmedo.

4.- Efectos de la perfusión con Pentoxifilina 10^{-4} M

Los efectos producidos por la perfusión con pentoxifilina sobre la actividad miocárdica se muestran en el registro de un experimento tipo luego de uno y 15 minutos de intervención farmacológica.

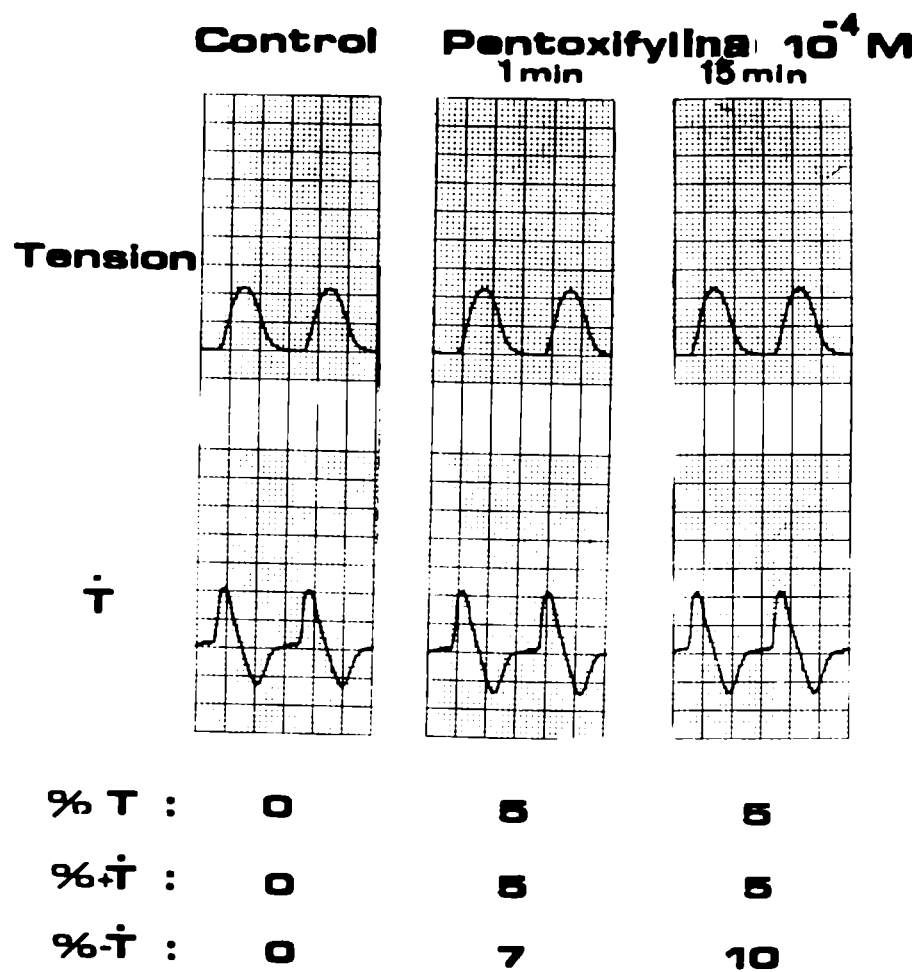


Figura 11: Registro de un experimento tipo mostrando la tensión desarrollada y su primera derivada con respecto al tiempo antes y después de la infusión de pentoxifilina 10^{-4} M. Velocidad de corrida del papel 50 mm/seg. Nótese el pequeño cambio en la actividad mecánica.

Las medias \pm E.S. de 9 experimentos al minuto y 12 experimentos a los 15 minutos se muestran en la figura 12. Luego de un minuto de perfusión se detectaron cambios pequeños pero significativos en el comportamiento contráctil, T, +T, -T, se incrementaron en $11 \pm 2\%$, 9 ± 3 y, $10 \pm 3\%$ respectivamente. Luego de 15 minutos el único parámetro mecánico en el que se detectaron cambios significativos fue -T con un incremento de $21 \pm 6\%$.

En los experimentos llevados a cabo en los animales reserpinizados (n=4) se detectaron esencialmente los mismos cambios en la actividad mecánica encontrándose a los 15 minutos un incremento significativo en -T de $16 \pm 3\%$.

La perfusión con pentoxifilina incrementa significativamente los niveles de AMPc y el cociente de actividad de la proteína quinasa AMPc dependiente. Luego de uno y 15 minutos -

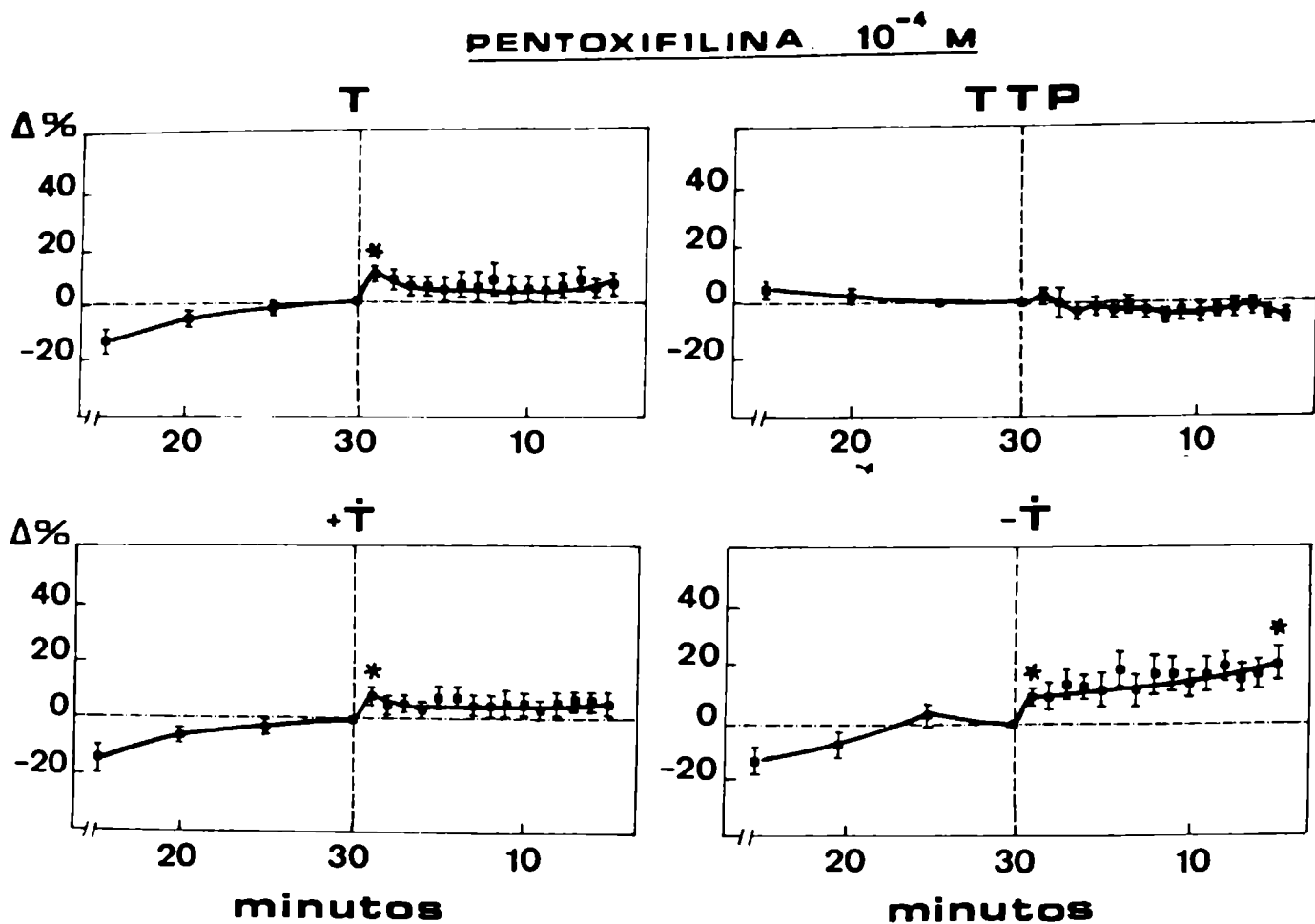


Figura 12: Transcurso en el tiempo de los resultados promedio para los parámetros mecánicos de los corazones per_fundidos con pentoxifilina.

(Fig. 13) los valores obtenidos para AMPc fueron de $0,604 \pm 0,034$ ($n=8$) y $0,645 \pm 0,047$ ($n=9$) picomoles/mg de tej. húmedo respectivamente. El cociente de actividades de la proteína quinasa - AMPc dependiente fue de $0,33 \pm 0,04$ ($n=8$) y $0,32 \pm 0,03$ ($n=9$) luego de uno y 15 minutos respectivamente. Los incrementos detectados para los niveles de GMPc, al minuto $9,7 \pm 1,4$ ($n=8$) y a los 15 minutos $10,9 \pm 1,1$ ($n=8$) femtomoles/mg tej. húmedo no fueron estadísticamente significativas.

COCIENTE DE ACTIVIDADES DE LA PROTEINA

QUINASA AMP_c - DEPENDIENTE

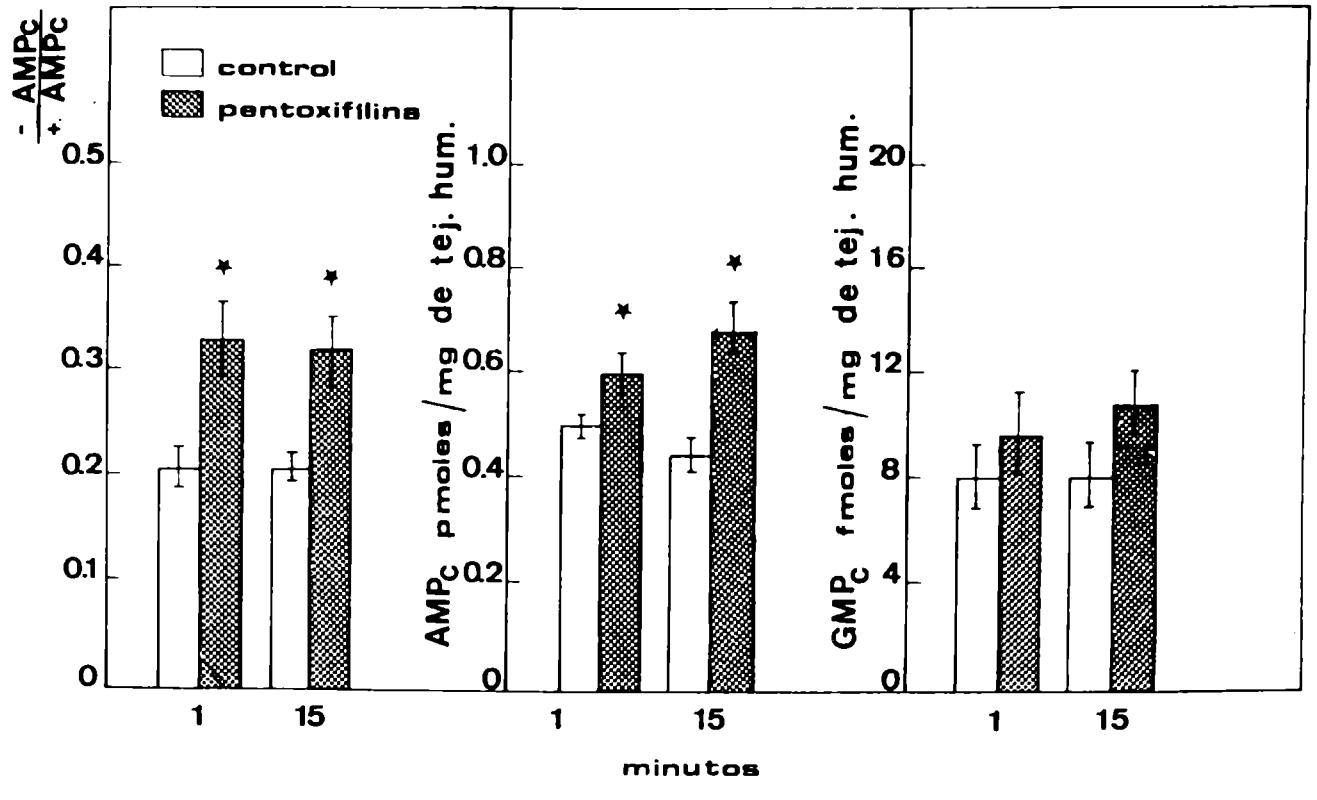


Figura 13: Cambios bioquímicos detectados en los corazones perfundidos con pentoxifilina. Se produjo un incremento estadísticamente significativo en los niveles de AMPc y en el cociente de actividades de la proteína quinasa AMPc dependiente. Los niveles de GMPc no se incrementaron significativamente. Los datos representan la media ⁺ ES. Los asteríscos indican las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

V.- DISCUSION Y CONCLUSIONES

En corazón de rata aislado y perfundido se estudió el efecto de tres agentes inhibidores de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos sobre la actividad mecánica, los niveles intracelulares de AMPc y GMPc y la actividad de la proteína quinasa AMPc-dependiente. Teofilina, uno de los agentes más comunmente usados como inhibidor de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (83); papaverina, derivado bencilisoquinolínico 10 a 100 veces más potente que el anterior (83,147) y pentoxifilina, un nuevo agente perteneciente al grupo de las metilxantinas (114-115).

En nuestras condiciones experimentales no se detectó ningún cambio en la actividad mecánica luego de la perfusión con teofilina y se obtuvieron cambios pequeños y transitorios luego de la administración de pentoxifilina y papaverina.

Los niveles intracelulares de AMPc y la actividad de la proteína quinasa AMPc-dependiente incrementaron significativamente al minuto o los 15 minutos de perfusión con las tres intervenciones farmacológicas. Los niveles intracelulares de GMPc fueron incrementados por las tres drogas, pero con pentoxifilina dicho incremento no fue estadísticamente significativo.

Rall y West (104) y Kukovetz y Poch (85) han reportado que las metilxantinas producen efecto inotrópico positivo. Dicho efecto depende de la dosis usada (41), de la diferencia de especies (118) y de las condiciones experimentales (118,150). Los resultados de los experimentos llevados a cabo por Blinks y colaboradores (41) concuerdan con nuestros datos ya que no detectan cambios significativos en la actividad mecánica cardíaca a dosis menores de 2 mM de teofilina.

La información previa respecto a los efectos de papaverina sobre la mecánica cardíaca es contradictoria. Hay coincidencia en que papaverina incrementa los niveles de AMPc, pero no sobre cual es su efecto sobre la contractilidad. Se ha reportado que deprime la actividad contráctil del miocardio de conejo(161-162), que ejerce un modesto efecto inotrópico positivo en corazón de cobayo(110) o aún un incremento sustancial de la contractilidad en músculo papilar de conejo(163). Nuestros datos concuerdan con aquellos que reportan cambios pequeños o ningún efecto en el comportamiento contráctil luego de la administración de papaverina. Además, la disminución pequeña, pero estadísticamente significativa detectada en el tiempo hasta la

tensión pico (TTP), sugiere un efecto relajante a la dosis usada.

Los resultados contradictorios reportados sobre los efectos mecánicos producidos por los inhibidores de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos podrían deberse a la diferencia de especies y de dosis o a cambios en el flujo coronario y en el "tono" simpático previos a la intervención farmacológica.

Para analizar la relación causa-efecto entre contractilidad y segundo mensajero se usaron tres inhibidores de las fosfodiesterasas a fin de elevar los niveles intracelulares de AMPc sorteando el receptor β . La posibilidad sin embargo, de tener efectos farmacológicos colaterales, ha sido descripta tempranamente (147) y Sutherland (105) sugiere el uso de más de un inhibidor simultáneo para descartar la posibilidad de que la droga actúe a través de un mecanismo distinto al de inhibir las fosfodiesterasas. Si no en todos, en la mayoría de los casos los incrementos intracelulares en los niveles de AMPc modifican la actividad de la proteína quinasa AMPc-dependiente (43,45,57,70,85,152,164). Por lo tanto, las siguientes posibilidades deben ser analizadas a fin de elucidar la controversia planteada entre la falta de cambios importantes en el comportamiento contráctil a pesar de haberse detectado incrementos significativos en los niveles de AMPc y en el cociente de actividades de la proteína quinasa AMPc-dependiente luego de la administración de los 3 inhibidores de las fosfodiesterasas usados:

1.- El llamado "efecto farmacológico colateral": Este efecto debe ser restringido a aquellos mecanismos independientes de la inhibición de las fosfodiesterasas y debe relacionarse a un efecto inotrópico negativo capaz de contrarestar el efecto inotrópico positivo debido al aumento del AMPc. Es decir, un efecto distinto del de elevar los niveles de AMPc, GMPc u otros nucleótidos cíclicos a través de la inhibición de las fosfodiesterasas (86). Este efecto inotrópico negativo es improbable que desempeñe un papel importante en los presentes resultados ya que se utilizaron 3 inhibidores de las fosfodiesterasas siendo uno de ellos de diferente estructura química.

2.- El efecto potenciador: Debe enfatizarse que los inhibidores de las fosfodiesterasas incrementan los niveles de varios nucleótidos cíclicos dentro de la célula. Si el inhibidor es usado simultáneamente con un agonista ϕ produciría un mayor incremento en los niveles intracelulares de AMPc y el efecto producido sobre la mecánica cardíaca no podría ser contra

restado por el relativamente menor incremento en los niveles intracelulares de los demás nucleótido cíclicos. De acuerdo con esta interpretación se debe destacar que a pesar de que los cambios provocados en la mecánica cardíaca luego de la administración de los inhibidores de las fosfodiesterasas son modestos, cambios sustanciales se detectarían si dichos inhibidores se administrarán conjuntamente con drogas que incrementarán selectivamente los niveles intracelulares de AMPc. La posibilidad de tener previamente incrementado el tono simpático ya sea por un incremento en los niveles de catecolaminas circulantes o por liberación de norepinefrina por las terminaciones nerviosas se descarta en nuestros experimentos por el cuidadoso ajuste de estimulación umbral y el período de estabilización al que se sometieron los preparados. Los experimentos llevados a cabo en animales deplecionados de catecolaminas por reserpina, descartan la posibilidad de que los inhibidores de las fosfodiesterasas usados en nuestro caso actúen por liberación de norepinefrina endógena (147).

3.- Posibilidad de un incremento en los niveles de AMPc sin una activación simultánea de la proteína quinasa AMPc dependiente: Esta posibilidad es muy importante si la acción del segundo mensajero es mediada a través de las propiedades fosforilantes de la proteína quinasa AMPc-dependiente. Investigaciones del grupo de Vanderbilt (44,152) y Dobson (164) indican una fuerte correlación en grado y tiempo entre la activación de la proteína quinasa AMPc-dependiente de corazón y su efecto sobre la contractilidad. Cualquier agente o inhibidor capaz de interferir con la subunidad catalítica de la proteína quinasa AMPc-dependiente puede anular su acción fosforilante a pesar de que los niveles de AMPc se encuentren incrementados. Se ha reportado la presencia de un inhibidor proteico de la proteína quinasa AMPc-dependiente (56,165). Sin embargo, esta posibilidad debe descartarse en nuestro estudio ya que en la mayoría de los grupos experimentales, los incrementos en los niveles intracelulares de AMPc fueron acompañados por incrementos en la actividad de la proteína quinasa AMPc-dependiente para los 3 inhibidores de la fosfodiesterasa usados. Se detectaron algunas veces, incrementos estadísticamente significativos en los niveles de AMPc, sin incrementos significativos en la actividad de la proteína quinasa AMPc-dependiente o viceversa, luego de 1 a 15 minutos de intervención farmacológica. Se podría especular sobre la existencia de inhibidores de la proteína quinasa AMPc-dependiente (56,41) o sobre una activación de la misma por una vía diferente (44) para explicar esta disociación.

Como así también es posible que se produzcan pequeños cambios en los niveles de AMPc imposibles de detectar experimentalmente pero suficientes para producir la activación de la proteína quinasa AMPc-dependiente. No obstante, con los tres inhibidores de las fosfodiesterasas usados fueron incrementados los niveles de AMPc o activada la proteína quinasa AMPc-dependiente, luego de uno o 15 minutos de intervención.

4.- Transcurso en el tiempo. Los experimentos se llevaron a cabo con registro continuo de la actividad mecánica, pero las determinaciones bioquímicas se realizaron al minuto y los 15 minutos de intervención farmacológica. Por lo tanto no se puede descartar la posibilidad de no haber detectado un pico de incremento en los parámetros bioquímicos estudiados. Sin embargo, si hubiéramos sido incapaces de detectar un pico de incremento en los niveles de AMPc o en la actividad de su proteína quinasa dependiente, la conclusión del presente estudio no cambiaría ya que se detectaron incrementos estadísticamente significativos a los 15 minutos de perfusión con los 3 inhibidores de las fosfodiesterasas usados, sin cambios significativos en la contractilidad.

5.- Otros efectos de los inhibidores de la fosfodiesterasa distintos al de incrementar los niveles de AMPc y activar su proteína quinasa dependiente. El efecto de los inhibidores de la fosfodiesterasa sobre los niveles de GMPc no ha sido extensivamente estudiado a pesar de la posibilidad de que el GMPc tenga acción regulatoria en el corazón, antagónica a la del AMPc (7), y la creciente evidencia de sus efectos bioquímicos (129-130,150-151,166). Estudios tempranos muestran que la perfusión de corazón de rata con acetilcolina produce aumentos de los niveles de GMPc que se correlacionan con disminución de la contractilidad (129). Se ha reportado que el derivado sustituido Br-cGMP produce efecto inotrópico negativo (7) y que la acción antagónica del isoproterenol y la acetilcolina sobre el miocardio se debía al incremento simultáneo de ambos nucleótidos dentro de la célula cardíaca (11). Por otra parte, otros autores han postulado la falta de asociación entre acetilcolina, GMPc y efecto inotrópico negativo, como así también una disminución en los niveles de AMPc luego de la administración simultánea de isoproterenol y acetilcolina con respecto a los niveles logrados cuando se administra isoproterenol (149,151, -167). Un estudio reciente de Keely y colaboradores (152) en el

cual se mide actividad de proteína quinasa AMPc dependiente, confirma ambos mecanismos: a) una disminución en los niveles de AMPc y en el cociente de actividades de la proteína quinasa AMPc-dependiente para una dosis dada de epinefrina cuando se administra acetilcolina y b) un incremento en los niveles de GMPc con una disminución de la contractilidad luego de la administración de acetilcolina. En pocas palabras, cuando se administra acetilcolina sola produce un rápido incremento en los niveles de GMPc y reduce notoriamente la tensión desarrollada sin alterar significativamente los niveles basales de AMPc o la actividad de su proteína quinasa dependiente. Aunque el incremento simultáneo en los niveles de GMPc, no puede ser tomado como prueba fehaciente de que es la causa de la falta de cambios de la contractilidad luego de la administración de los inhibidores de las fosfodiesterasas, el incremento mostrado en nuestros datos sugiere dicha hipótesis.

Concluyendo, con los tres inhibidores de las fosfodiesterasas usados en corazón de rata perfundido bajo condiciones rigurosamente controladas se observa poco o ningún cambio en el comportamiento contráctil a pesar de los incrementos hallados en los niveles intracelulares de AMPc y en la actividad de la proteína quinasa AMPc-dependiente. Se detectó un incremento simultáneo de los niveles intracelulares de GMPc, el cual no alcanzó diferencia estadísticamente significativa para pentoxifilina.

El incremento simultáneo de los niveles de GMPc en corazón nos lleva a considerar la posibilidad de que dicho incremento desempeñe un rol importante por sí mismo o a través de un intermediario común en la inhibición de los cambios mecánicos producidos en el corazón luego de la administración de los inhibidores de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos y explicaría así la falta de cambios contráctiles significativos a pesar de los incrementos logrados en los niveles de AMPc.



BIBLIOGRAFIA

- 1.- Sutherland, E.W. y Rall, T.W. Am. Chem. Soc., 79, 3608, (1957).
- 2.- Sutherland, E.W. y Rall, T.R. J. Biol. Chem. 232, 1077, (1958).
- 3.- Greengard, P. y Kuo, J.F. Adv. Biochem. Psychopharmacol. 3, 287, (1970).
- 4.- Ashman, D.F., Lipton, R., Melicow, M.M. y Price, T.D. Biochem. Biophys. Res. Commun. 11, 330, (1963).
- 5.- Kuo, J.F. y Greengard, P.J. Biol Chem. 245, 2493, (1970).
- 6.- Kuo, J.F., Wyatt, G.R. y Greengard, P.J. Biol. Chem. 246, 7159, (1971).
- 7.- Nawrath, H. Nature 262, 509, (1976).
- 8.- Sutherland, E.W., Rall, T.W. y Menon, T.J. Biol. Chem. 237, 1220, (1962).
- 9.- Drummond, G.I. y Duncan, L.J. Biol. Chem. 245, 976, (1970).
- 10.- Tada, M., Finney Jr. J.O., Swartz, M.H. y Katz, A.M.J. Mol. Cellular Cardiol. 4, 417, (1972).
- 11.- Watanabe, A.M. y Besch, Jr. H.R. J.Mol. Cellular Cardiol. 7, 563, (1975).
- 12.- Entman, M.L., Levey, S.G. y Epstein, S.E. Biochem. Biophys. Res. Commun, 35, 728, (1969).
- 13.- Engelhard, V.H., Plut, D.A. y Storm, D.R. Biochim. Biophys. Acta 451, 48, (1976).
- 14.- Haga, T., Haga, K. y Gilman, A.G. J. Biol. Chem. 252, 5776, (1977).
- 15.- Limbird, L.E. y Lefkowitz, R.J. J. Biol. Chem. 252, 799, (1977).
- 16.- Robison, G.A., Butcher, R.W. y Sutherland, E.W. Cyclic AMP., New York: Academic, (1971).

- 17.- Klainer, L.M., Chi, Y.M., Freidberg, S.L., Rall, T.W. y Sutherland, E.W. J. Biol. Chem. 237, 1239, (1962).
- 18.- Birnbaumer, L., Pohl, S.L., Krans, M.L. y Rodbell, M. Adv. Biochem. Psychopharmacol. 3, 185, (1970).
- 19.- Rodbell, M. Current Topics in Biochemistry. editado por C.B. Anfinsen, R.F. Goldberg y A.N. Schechter, Academic Press, New York, (1972).
- 20.- Murad, F., Chi, Y.M., Rall, T.W. y Sutherland, E.W. J. Biol. Chem. 237, 1233, (1962).
- 21.- Cheung, W.Y. y Willianson, J.R. Nature. 207, 979, (1965).
- 22.- Drummond, G.I., Duncan, L. y Hertzman, E. J. Biol. Chem. 241, 5899, (1966).
- 23.- Namm, D.H. y Mayer, S.E. Mol. Pharmacol. 4, 61, (1968).
- 24.- Kukovetz, W.R., Poch, G. y Wurn, A. Naunyn-Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol. 278, 403, (1973).
- 25.- Kukovetz, W.R., Pöch, G. y Wurn, A. Advan. Cyclic Nucleotide Res. 5, 395, (1975).
- 26.- Schumann, H.J., Endoh, M. y Brodde, O.E. Naunyn-Schiedeberg's. Arch. Pharmacol. 289, 291, (1975).
- 27.- Dobson, Jr. J.G., Ross, Jr. J. y Mayer, S.E. Circulation Res. 39, 388, (1976).
- 28.- Mayer, S.E. J. Pharmacol. Exp. Ther. 181, 116 (1972).
- 29.- Kaumann, A.J. y Birnbaumer, L. J. Biol. Chem. 249, 7874, (1974).
- 30.- Picken, G.M. y Jarrott, B. Biochem. Pharmacol. 24, 2255, (1975).
- 31.- Sobel, B.E. y Mayer, S.E. Circulation Res. 32, 407, (1973).
- 32.- Benfey, B.G. Br.J. Pharmacol. 43, 757, (1971)
- 33.- Benfey, B.G. y Carolin, T. Can. J. Physiol. Pharmacol. 49, 508, (1971).

- 34.- Kjekshus, J.K., Henry, P.D. y Sobel, B.E. Circulation Res. 29, 468, (1971).
- 35.- Skelton, C.L., Levey, G.S. y Epstein, S.E. Circulation Res. 26, 35, (1970).
- 36.- Wilkerson, R.D., Paddock, R.J. y George, W. Eur.J. Pharmacol. 36, 247, (1976).
- 37.- Kukovetz, W.R., Pösch, G. Naunyn-Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol. 266, 236, (1970).
- 38.- Drummond, G.I. y Hemmings, S.J. Advan. Cyclic Nucleotide Res. 1, 307, (1973).
- 39.- Meinertz, T., Nawrath, H. y Scholz, H. Naunyn-Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol. 277, 107, (1973).
- 40.- Meinertz, T., Nawrath, H. Scholz, H. y Winter, K. Naunyn-Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol. 282, 143, (1974).
- 41.- Blinks, J.R., Olson, C.B., Jewell, B.R. y Braveny, P. Circulation Res. 30, 367, (1972).
- 42.- Korth, M. Naunyn-Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol. 302, 77, (1978).
- 43.- Corbin, J.D. y Keely, S.L. J. Biol. Chem. 252, 910, (1977).
- 44.- Keely, S.L. y Corbin, J. D. Am. J. Physiol: Heart. Circ. Physiol. 2, H269, (1977).
- 45.- Keely, S.L., Corbin, J.D. y Park, C.R. J. Biol. Chem. 250, 4832, (1975).
- 46.- Krebs, E.G. Curr. Top. Cell. Regul. 5, 99, (1971).
- 47.- Langan, T.A. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 3, 99 (1973).
- 48.- Kuo, J.F. y Greengard, P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64, 1349, (1969).
- 49.- Walsh, D.A., Perkins, J.P. y Krebs, E.G. J. Biol. Chem. 243, 3763, (1968).

- 50.- Brostrom, M.A., Reimann, E.M., Walsh, D.A. y Krebs, E.G.
Advan.Enzyme Regulation 8, 191, (1970).
- 51.- Kuo, J.F. y Greengard, P. Biochim. Biophys. Acta 212, 434,
(1970).
- 52.- Gill, G.N. y Garren, L.D. Biochem. Biophys. Res. Commun.
39, 335, (1970).
- 53.- Hofmann, F., Beavo, J.A., Bechtel, P.J. y Krebs, E.G. J.
Biol. Chem. 250, 7795, (1975).
- 54.- Rosen, O.M. y Erlichman, J. J. Biol. Chem. 250, 7788,
(1975).
- 55.- Tao, M. Salas, M.L., Lipmann, F. Proc. Natl. Acad. Sci.
USA. 67, 408, (1970).
- 56.- Beavo, J.A. Bechtel, P.J. y Krebs, E.G. Proc. Natl. Acad.
Sci. USA. 71, 3580, (1974).
- 57.- Corbin, J.D., Keely, S.L. y Park, C.R. J. Biol. Chem.
250, 218, (1975).
- 58.- Corbin, J.D. y Reimann, E.M. Methods Enzymol. 38, 287,
(1974).
- 59.- Erlichman, J., Rosenfeld, R. y Rosen, O.M. J. Biol. Chem.
249, 5000, (1974).
- 60.- Rangel-Aldao, R. y Rosen, O.M. J. Biol. Chem. 251, 3375,
(1976).
- 61.- Rangel-Aldao, R. y Rosen, O.M. J. Biol. Chem. 251, 7526,
(1976).
- 62.- Chou, C.K., Alfano, J. y Rosen, O.M. J. Biol. Chem. 252,
2855, (1977).
- 63.- Sulakhe, P.V., Leung, N.L. y St. Louis, P.J. Can. J.
Biochem. 54, 438, (1976).
- 64.- Hicks, J.M., Shigekawa, M. y Katz, A.M. Circulation. Res.
44, 384, (1979).

- 65.- Schwartz, A., Entman, M.L., Kanike, K., Lane, L.A., Van-
Winkle, W.B. y Bornet, E.P. Biochim. Biophys. Acta 426,
57, (1976).
- 66.- Tada, M., Kirchberger, M.A. y Li, H.C. J. Cyclic Nucleo-
tide Res. 1, 329, (1975).
- 67.- Tada, M., Kirchberger, M.A. y Katz, A.M. J. Biol. Chem.
250, 2640, (1975).
- 68.- Fedelosova, M. y Ziegelhoffer, A. Experientia. 35, 518,
(1975).
- 69.- England, P.J. FEBS Letters. 50, 57, (1975).
- 70.- Rubio, R., Bailey, C. y Villar-Palasi, C.J. Cyclic Nucleo-
tide Res. 1, 143, (1975).
- 71.- Mc Clellan, G.B. y Winegrad, S. Gen. Physiol. 72, 737,
(1978).
- 72.- Hui, C.W., Drummond, M. y Drummond, G. Arch. Biochem.
Biophys. 173, 415, (1976).
- 73.- Krause, E.G., Will, H., Pelouch, V. y Wollenberger, A.
Acta Biol. Med. Ger. 31, K37, (1973).
- 74.- Gibson, K. y Newcombe, M. Biochem. Soc. Trans. 3, 547,
(1975).
- 75.- Kirchberger, M.A., Tada, M. y Katz, A.M. J. Biol. Chem.
249, 6166, (1974).
- 76.- Wray, H.L., Gray, R.R. y Olson, R.A. J. Biol. Chem. 248,
1496, (1973).
- 77.- Tada, M., Kirchberger, M.A. Repke, D.I. y Katz, A.M. J.
Biol. Chem. 249, 6174, (1974).
- 78.- Bailey, C. y Villar-Palasi, C. Federation Proc. 30, 1147,
(1971).
- 79.- Reddy, Y.S., Ballard, D., Giri, N.Y. y Schwartz, A.J. Mol.
Cellular Cardiol. 5, 461, (1973).

- 80.- Cole, H.A. y Perry, S.V. Biochem. J. 149, 525, (1975).
- 81.- England, P.J. Biochem. J. 160, 295, (1976).
- 82.- Butcher, R.W. y Sutherland, E.W. J. Biol. Chem. 237, 1244, (1962).
- 83.- Appleman, M.N., Thompson, W.J. y Russell. T.R. Advan. Cyclic Nucleotide Res. 3, 65, (1973).
- 84.- Krause, E.G. y Wollenberger, A. Cyclic Nucleotides and Heart. In Cyclic Nucleotides: Mechanism of Action, editado por H. Cramer y J. Schultz. Wiley, New York. 13, 229, (1976).
- 85.- Kukovetz, W.R. y Poch, G. Advan. Cyclic Nucleotide Res. 1, 262, (1972).
- 86.- Kuo, J.F., Shoji, M., Brackett, N.L. y Helfman, D. M.J. Cyclic Nucleotide Res. 4, 463, (1978).
- 87.- Ho, H.C., Wirch, E., Stevens, F.C. y Wang, J.H. J. Biol. Chem. 252, 43, (1977).
- 88.- Teo, T.S. y Wang, J.H. J. Biol Chem. 248, 5950, (1973).
- 89.- Brostrom, C.M. y Wolff, D.J. Arch. Biochem. Biophys. 165, 715, (1974).
- 90.- Kakiuchi, S., Yamazaki, R., Teshima, Y. y Uenishi, K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70, 3526, (1973).
- 91.- Uzunov, P., Lehne, R. , Revuelta, A.V., Gnegy, M.E. y Costa, E. Biochim. Biophys. Acta 422, 326, (1976).
- 92.- Uzunov, P. Y Weiss, B. Biochim. Biophys. Acta 284, 220, (1972).
- 93.- Wells, J.N., Baird, C.E., Wu, Y.J. y Hardman, J.G. Biochim. Biophys. Acta 384, 430, (1975).
- 94.- Brostrom, C.O. y Wolff, D.J. Arch. Biochem. Biophys. 172, 301, (1976).
- 95.- Ho, H.C., Teo, T.S., Desai, R. y Wang, J.H. Biochim. Biophys. Acta 429, 461, (1976).

- 96.- Wells, J.N., Wu, Y.J., Baird, C.E. y Hardman, J.G. Mol. Pharmacol. 11, 775, (1975).
- 97.- Lindl, T. y Chapman, G. Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 1273, (1976).
- 98.- Marcus, R. Endocrinology. 96, 400, (1975).
- 99.- Russell, T.R., Terasaki, W.L. y Appleman, M.M. J. Biol. Chem. 248, 1334, (1973).
- 100.- Thompson, W.J. y Appleman, M.M. J. Biol. Chem. 246, 3145, (1971).
- 101.- Beavo, J.A., Hardman, J.G. y Sutherland, E.W. J. Biol. Chem. 245, 5649, (1970).
- 102.- Beavo, J.A., Hardman, J.G. y Sutherland, E.W. y Biol. Chem. 246, 3841, (1971).
- 103.- Franks, D.J. y Macmanus, J.P. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 844, (1971).
- 104.- Rall, T.W. y West, T.C. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 139, 269, (1963).
- 105.- Sutherland, E.W., Robison, G.A. y Butcher, R.W. Circulation 37, 279, (1968).
- 106.- Mc. Neil, J.H., Nassar, M. y Brody, T.M. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 165, 234, (1969).
- 107.- De Gubareff, T. y Sleator, W. Jr. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 48, 202, (1965).
- 108.- Nayler, W.G. Am. Heart. 73, 379, (1967).
- 109.- Westfall, D.P. y Fleming, W.W. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 159, 98, (1968).
- 110.- Klaus, W., Krebs, R. y Seitz, N. Naunyn-Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol. 267, 99, (1970).
- 111.- Heitmann, M., Meinertz, T., Schmelzle, B. y Sholz, H. Naunyn-Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol. 293, R96, (1976).

- 112.- Mc Neill, J.H., Coutinho, F.E. y Verna, S.C. Can. J. Physiol. Pharmacol. 52, 1095, (1974).
- 113.- Verma, S.C. y Mc Neill, J.H. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 221, 4, (1976).
- 114.- Stefanovich, V. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 5, 655, (1973).
- 115.- Popendiker, K., Boksay, I. y Bollman, V. Arzneim. Forsch. Drug. Res. 21, 1160, (1971).
- 116.- Stefanovich, V. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 8, 673, (1974).
- 117.- Endoh, M. y Schumann, H. J. European J. Pharmacol. 30, 213, (1975).
- 118.- Henry, P.D., Dobson, J.G. Jr. y Sobel, B.E. Circulation Res. 36, 392, (1975).
- 119.- Amer, M.S. y Kreighbaum, W.E. J. Pharm. Sci. 64, 1, (1975).
- 120.- Lugnier, C. y Stoclet, J.C. Biochem. Pharmacol. 23, 307, (1974).
- 121.- Poch, G. y Kukovetz, R. Life Sci. 10, 133, (1971).
- 122.- Kimura, H. y Murad, F. J. Biol. Chem. 249, 6910, (1974).
- 123.- Limbird, L.E. y Lefkowitz, R. J. Biochem. Biophys. Acta 377, 186, (1975).
- 124.- St. Louis, P.J. y Sulakhe, P.V. Biochem. J. 158, 535, (1976).
- 125.- Sulakhe, P.V., Sulakhe, S.J., Leung, N.L., St. Louis, P.J. y Hickie, R.A. Biochem. J. 157, 705, (1976).
- 126.- Sulakhe, S.J., Leung, N.L. y Sulakhe, P.V. Biochem. J. 157, 713, (1976).
- 127.- Ong, S.H. y Steiner, A.L. Science 197, 183, (1976).
- 128.- Goldberg, N.D. y Haddox, M.K. Ann. Rev. Biochem. 46, 823, (1977).
-

- 129.- George, W.J., Polson, J.B., O'Toole, A.G. y Goldberg, N.D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 66, 398, (1970).
- 130.- George, W.J., Wilkerson, R.D. y Kadowitz, P.J. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 184, 228, (1973).
- 131.- Lee, T.P., Kuo, J.F. y Greengard, P. Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 991, (1971).
- 132.- Higgins, C.B., Vatner, S.F. y Braunwald, E. Pharmacol. Rev. 25, 120, (1973).
- 133.- Kuo, J.F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 4037, (1974).
- 134.- Kuo, J.F., Sones, J. y Greengard, P. Fed. Proc. 29, 601, (1970).
- 135.- Sold, G. y Hofmann, F. European J. Biochem. 44, 143, (1974).
- 136.- Miyamoto, E., Petzold, G.L., Kuo, J.F. y Greengard, P. J. Biol. Chem. 248, 179, (1973).
- 137.- Gill, G.N., Holdy, K.E., Walton, G.M. y Kanstein, C.B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 3918, (1976).
- 138.- Gill, G.N. J. Cyclic Nucleotide Res. 3, 153, (1977).
- 139.- De Jonge, H.R. y Rosen, M.O. J. Biol. Chem. 252, 2780, (1977).
- 140.- Khoo, J.D., Sperry, P.J., Gill, G.N. y Steinberg, D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 4843, (1977).
- 141.- Lincoln, T.M. y Corbin, J.D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 3239, (1977).
- 142.- Blumenthal, D.K., Stull, J.T. y Gill, G.N. J. Biol. Chem. 253, 334, (1978).
- 143.- Lincoln, T.M. y Corbin, J.D. J. Biol. Chem. 253, 337, (1978).
- 144.- Lincoln, T.M., Hall, C.L., Park, C.R. y Corbin, J.D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 2559, (1976).

- 145.- Brodde, O.E., Motomura, S., Endoh, M. y Schumann, H.J.
J. Mol. Cellular Cardiol. 10, 207, (1978).
- 146.- Shanfeld, J., Frazer, A. y Hess, M.E. J. Pharmacol. Exptl.
Therap. 169, 315, (1969).
- 147.- Tsien, R.W. Advan. Cyclic Nucleotide. Res. 8, 363, (1977)
- 148.- Brooker, G.J. Cyclic Nucleotide Res. 3, 407, (1977).
- 149.- Diamond, J., Teen Eick, R.E. y Trapani, A. J. Biochem.
Biophys. Res. Commun. 79, 912, (1977).
- 150.- Katsuki, S., Arnold, W.P. y Murad, F. J. Cyclic Nucleo-
tide Res. 3, 239, (1977).
- 151.- Keely, S.L. Jr. y Lincoln, T.M. Biochem. Biophys. Acta.
General Subjects. 543, 251, (1978).
- 152.- Keely, S.L., Lincoln, T.M. y Corbin, J.D. Am. J. Physiol.
Heart. Circ. Physiol. 3, H 432, (1978).
- 153.- Nestler, E.J., Beam, K.G. y Greengard, P. Nature 275,
451 (1978).
- 154.- Watanabe, A.M. y Besch, H.R. Jr. Circulation Res. 37,
309, (1975).
- 155.- Langendorff, O. Pflueger's Archiv fur die Gesamte Phy-
siologie des Menschen und der Tiere. 61, 291, (1895).
- 156.- Wollenberger, A., Ristau, O. y Schoffa, G. Pflueger's
Archiv. fur die Gesamte Physiologie des Menschen und
der Tiere. 270, 399, (1960).
- 157.- Wastila, W.B., Stull, J.T., Mayer, S.E. y Walsh, D.A.
J. Biol. Chem. 246, 1996, (1971).
- 158.- Harper, J.F. y Brooker, G. J. Cyclic Nucleotide Res.
1, 207, (1975).
- 159.- Steiner, A.L., Parker, Ch. W. y Kipnis, D.M. J. Biol.
Chem. 247, 1106 (1972).
- 160.- Steiner, A.L., Pagliara, A.S., Chase, L.R. y Kipnis, D.M.
J. Biol. Chem. 247, 1114, (1972).

- 161.- Alles, G.A. y Ellis, Ch. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 104, 253, (1952).
- 162.- Melville, K.I. y Lu, F.C. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 99, 286, (1950).
- 163.- Endoh, M., Brodde, O.E. y Shuman, H.J. J. Mol. Cellular Cardiol. 7, 703, (1975).
- 164.- Dobson, J.G. Jr. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 3, H638, (1978).
- 165.- Walsh, D.A., Ashby, Ch. D., Gonzales, C., Calkins, D., Fisher, H.E. y Krebs, E.G. J. Biol. Chem. 246, 1977, (1971).
- 166.- Gardner, R.M. y Allen, D.O. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 198, 412, (1976).
- 167.- George, W.J., Ignaro, L.J., Paddock, R.S., White, L. y Kadowitz, P.J. J. Cyclic Nucleotide Res. 1, 339, (1975).